



MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA



MONITORIZAÇÃO DO ADOÇANTE CICLAMATO DE SÓDIO ATRAVÉS DE SENSOR ÓPTICO

João Baía

Novembro 2010

Mestrado	Engenharia Química, Optimização Energética na Indústria Química
Instituição acolhimento	ISEP, Instituto Superior de Engenharia do Porto
Título	Monitorização do adoçante ciclamato de sódio através de sensor óptico
Autor	João Manuel Fernandes Baía
Orientadora	Professora Doutora Maria Goreti Ferreira Sales
Data da publicação	15 de Novembro de 2010

Agradecimentos

Este espaço é dedicado àqueles que deram a sua contribuição permitindo que o trabalho fosse realizado com sucesso. A todos eles expresso, aqui, os meus sinceros agradecimentos.

Dirijo em particular os meus agradecimentos ao Engenheiro Crispim, pela sua compreensão e flexibilidade que me permitiu compatibilizarem este trabalho com a minha vida profissional, à Doutora Goreti Sales pela forma como se disponibilizou, orientou e apoiou o trabalho e também à Felismina e Rafaela pelo apoio que me deram.

Finalmente, não posso deixar de agradecer a compreensão e apoio dado pelas minhas filhas.

Resumo

O presente trabalho pretendeu desenvolver e testar um sensor óptico para detectar ciclamato de sódio, um adoçante artificial utilizado nas bebidas em geral. A primeira abordagem neste sentido baseou-se na preparação de um sensor óptico através da formação de complexos corados entre o ciclamato e várias espécies metálicas, nomeadamente Hg(II), Ba(II), Fe(II), Ag(II), Pb(II), Cd(II), Mn (II), Ni(II), Cu(II), Co(II), Sn(II) e Mg(II). Perante a ausência de resultados satisfatórios optou-se por explorar a acção do ciclamato de sódio na transferência/partilha de um corante entre duas fases líquidas imiscíveis.

As fases líquidas utilizadas foram a água e o clorofórmio. Testaram-se várias famílias de corantes mas só uma classe se mostrou com as características apropriadas para o objectivo pretendido. Dentro dessa família de corantes, seleccionou-se aquele que, à partida, garantiu o melhor desempenho. O sensor foi testado em diferentes condições de pH e também na presença de potenciais interferentes de forma a estabelecer as melhores condições de utilização. O método mostrou-se bastante simples de executar, rápido na obtenção de resultados e com boas características para ser avaliado visualmente, mas sempre de acordo com os critérios de objectividade que um trabalho deste tipo requer. Além o disso permitiu ser calibrado de uma forma rápida e simples, características essenciais para a aplicação deste método na despistagem de ciclamato em análises de rotina.

O método desenvolvido foi ainda aplicado à análise de vinho dopado com diferentes concentrações de ciclamato de sódio. Destes testes verificou-se a necessidade de optimização do método através da introdução de outras substâncias na fase não aquosa diminuindo a vulnerabilidade do sensor a outros interferentes.

Como conclusão, o método correspondeu às expectativas, mostrando-se viável para aplicação à análise de vinhos, ainda com uma margem significativa de desenvolvimento no sentido de o tornar mais fiável e preciso.

Palavras-chave: vinho, adoçantes artificiais, ciclamato, corantes, cor, colorimetria, espectrofotometria, luz visível.

Abstract

The purpose of this study was to develop an optical sensor to detect the artificial sweetener sodium cyclamate in beverages, in case of wine. This thesis mainly describes the development and characterization of a type sensor based on a dye transfer between two immiscible liquid phases, from water to chloroform.

In the research phase was attempted, first, to obtain an optical sensor by forming colored metal complexes, including Hg (II), Ba (II), Fe (II), Ag (II), Pb (II), Cd (II), Mn (II), Ni (II), Cu (II), Co (II), Sn (II) and Mg (II) but without clear results. Later we tested a method that involves the transfer of dye from aqueous phase to an immiscible phase consisting of chloroform by the action of sodium cyclamate. The method was quite simple to implement, fast in delivering results and with good characteristics to be assessed visually but always in accordance with criteria of objectivity that such work requires. Besides the necessary permits to be calibrated in a quick and simple it is to be used as screening quantified.

We tested several families of colors but only one class has proved to the characteristics necessary for the method. Within this family of dyes are selected that, at the outset, assured the best performance. The sensor was tested under different pH and also in the presence of potential interferences in order to establish the best conditions. Finally it was tested in the function for which it was designed, with raw green wine doped with different concentrations of sodium cyclamate. These tests proved necessary to introduce other substances in the aqueous phase do not decrease the vulnerability of the sensor to interferences.

In conclusion, the method up to expectations, proved to be feasible even with significant scope for development in order to make it more reliable and accurate.

Índice

1. Introdução	1
1.1 Utilização de adoçantes artificiais	1
1.2 Métodos de análise usados na detecção de adoçantes	2
1.2.1 Cromatografia líquida	3
1.2.2 Cromatografia gasosa	4
1.2.3 Electroforese capilar	4
1.2.4 Análise por injeção em fluxo	4
1.2.5 Técnicas electroquímicas	5
1.2.6 Técnicas espectroscópicas	5
1.3 Sensores ópticos	6
1.3.1 Luz	6
1.3.2 Objecto	8
1.3.3 Observador	11
1.3.4 Equipamento de medida (transmitância/reflectância)	15
1.4 Matemática da cor	16
1.4.1 Lei de Beer	16
1.4.2 Lei de Kubelka Munk	17
2. Descrição Experimental	19
2.1 Considerações gerais	19
2.2 Material e equipamentos utilizados	19
2.3 Reagentes	20
2.4 Estudos preliminares	20
2.4.1 Obtenção de complexos corados	20
2.4.2 Transferência de cor entre fases imiscíveis através do ciclamato	21
2.5 Optimização e selecção do corante	21
2.6 Efeito do pH	21
2.7 Interferentes	22
2.8 Aplicação do sistema sensor	22
3. Resultados e Discussão	23
3.1 Considerações gerais	23
3.2 Formação de complexos corados	23
3.3. Transferência de corante entre duas fases imiscíveis	25
3.4 Efeito de tipo/concentração do corante	27
3.5 Efeito do pH	31
3.6 Interferentes	33
3.7 Teste com amostras de vinho	35
3.8 Alteração metodológica e sua aplicação	36
4. Conclusões	38
Referências Bibliográficas	40

Índice de figuras

Figura 1.1 Estrutura química do Ciclamato.....	2
Figura 1.2 Espectro electromagnético	7
Figura 1.3 Cores do espectro electromagnético na região visível	7
Figura 1.4 Distribuição da energia espectral relativa de diversos iluminantes padrões: luz do dia (D65), lâmpada incandescente (A), lâmpada fluorescente TL84 da Philips (F11) e lâmpada fluorescente “fria” (F2)	8
Figura 1.5 Reflexão especular	9
Figura 1.6 Transmissão especular.....	9
Figura 1.7 Reflexão difusa	9
Figura 1.8 Objecto com reflexão especular, transmissão especular, reflexão difusa e transmissão difusa.	10
Figura 1.9 Objecto com corante vermelho	10
Figura 1.10 Espectros de reflectância para objectos de cores diferentes	11
Figura 1.11 Sensibilidade espectral relativa de um observador standard segundo a CIE	12
Figura 1.12 Diagrama de cromaticidades de CIE	13
Figura 1.13 Espaço de cor da CIE Lab, 1976	14
Figura 1.14 Esquema de um espectrofotómetro de feixe duplo para medir amostras opacas ou transparentes	15
Figura 3.1 Obtenção de cor por complexação em $\text{pH} \approx 5,8$	24
Figura 3.2 Obtenção de cor por complexação em $\text{pH} < 4$	24
Figura 3.3 Obtenção de cor por complexação em $\text{pH} > 10$	25
Figura 3.4 Ensaios com diversos corantes	26
Figura 3.5 Absorvância versus concentração ciclamato relativamente ao corante Azul Metileno preparado com várias concentrações	28
Figura 3.6 Absorvância versus concentração ciclamato relativamente ao corante Verde Astrazon M preparado com várias concentrações	28
Figura 3.7 Absorvância versus concentração ciclamato versus concentração do corante Amarelo Astrazon BGE.....	29
Figura 3.8 Absorvância versus concentração ciclamato versus concentração do corante Azul Astrazon BG	29
Figura 3.9 Absorvância versus pH à concentração de ciclamato de 0,0050 M	31
Figura 3.10 Absorvância versus concentração de ciclamato face a vários valores de pH	32
Figura 3.11 Absorvância versus concentração de ciclamato face a várias concentrações de frutose	33
Figura 3.12 Absorvância versus concentração de ciclamato face a várias concentrações de sacarose	34
Figura 3.13 Absorvância versus concentração de ciclamato para duas concentrações diferentes de açúcar total	35
Figura 3.14 Absorvância versus concentração de açúcar total em vinho versus concentração de ciclamato	37

Índice de tabelas

Tabela 3.1 Factores de desempenho dos diversos corantes a diferentes concentrações	31
Tabela 3.2 Factores de desempenho a diferentes valores de pH.....	33
Tabela 3.3 Factores de desempenho do corante na presença da frutose e sacarose a diferentes concentrações	35
Tabela 3.4 Factores de desempenho do corante em vinho com diferentes níveis de açúcar total.....	36
Tabela 3.5 Factores de desempenho do corante em vinho com diferentes níveis de açúcar total utilizando uma mistura de clorofórmio/tetracloreto de carbono.....	37

Lista de abreviaturas

HPLC High Performance Liquid Chromatography

IC Ion Chromatography

CE Cappelary Electrophoresis

FIA Flow injection analysis

LC Liquid Chromatography

TLC Thin-layer chromatography

GC Gas Chromatography

Ca^{2+} Cálcio (II)

Ag^{2+} Prata (II)

Cu^{2+} Cobre (II)

Zn^{2+} Zinco (II)

Mg^{2+} Magnésio (II)

Hg^{2+} Mercúrio (II)

Sn^{2+} Estanho (II)

Pb^{2+} Chumbo (II)

Mn^{2+} Manganês (II)

Fe^{2+} Ferro (II)

Cd^{2+} Cádmio (II)

Ni^{2+} Níquel (II)

Ba^{2+} Bário (II)

1. Introdução

1.1 Utilização de adoçantes artificiais

Os adoçantes artificiais (também chamados edulcorantes) formam uma importante classe de aditivos alimentares. São usados, cada vez mais, em alimentos, bebidas, produtos de confeitaria e na indústria farmacêutica. Eles fornecem a sensação intensa de doçura, mas com pouca ou nenhuma ingestão de conteúdo energético.

A indústria alimentar promove intensamente os seus produtos adoçados artificialmente, destacando os seus benefícios em bebidas e alimentos de baixa valor calórico, com o argumento que podem prevenir e diminuir a obesidade, manter o peso corporal e controlar a diabetes. Além disso, os adoçantes artificiais são considerados “amigos” dos dentes por não serem fermentados pelas bactérias da placa dentária. No entanto, estes adoçantes estão entre os aditivos mais controversos, devido a suspeitas de efeitos adversos para a saúde. Destacam-se problemas dermatológicos, dores de cabeça, variações de humor, mudanças de comportamento, dificuldades respiratórias, convulsões, alergias e até cancro.

Neste sentido, apenas alguns dos muitos edulcorantes intensos conhecidos podem ser utilizados na indústria alimentar. A lista de adoçantes artificiais autorizados varia de país para país. Na União Europeia são autorizados seis adoçantes artificiais de alta

intensidade para uso alimentar: ciclamato, acessulfame de potássio, aspartame, sacarina, sucralose e a neo-hesperidina [1], apesar de nos EUA não ser permitida a utilização de ciclamato e a neo-hesperidina [2].

De uma forma geral, os adoçantes podem ser utilizados separadamente ou combinados entre si, porque individualmente podem proporcionar paladares paralelos e/ou residuais que limitam a sua aplicação em alimentos e bebidas. Verificou-se que uma mistura de adoçantes faz com que o paladar indesejável de um adoçante possa ser colmatado por outro, além da redobrada sensação de doçura [3]. Entre as combinações mais frequente encontra-se a do ciclamato e sacarina [4]. O sabor residual amargo da sacarina é mascarado pelo ciclamato e o sabor desagradável de ciclamato é mascarado pela sacarina. Ao mesmo tempo, o poder adoçante da mistura aumenta.

O ciclamato, ou E952, encontra-se entre os compostos mais utilizados como adoçante no sector alimentar (Figura 1.1). Ele pode estar presente como sal de sódio ou de cálcio. Os seus valores limite são iguais a 400 mg/L em bebidas e variam entre 250 e 2500 mg/Kg em sobremesas e produtos de pastelaria.

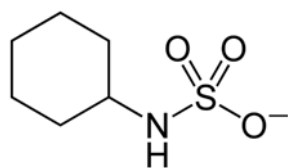


Figura 1.1 – Estrutura química do Ciclamato

A sua utilização foi, no entanto, rodeada de controvérsia. Alguns estudos sugeriram que o ciclamato, uma vez ingerido, pode sofrer hidrólise no ambiente ácido do estômago ou ser metabolizado por bactérias intestinais, resultando na formação da ciclo-hexilamina. Este composto apresenta uma toxicidade extrema e suspeita-se que esteja associado a situações de cancro. Mas, em 2000, a Agência Europeia de Segurança Alimentar publicou o seu parecer sobre a segurança do ciclamato, afirmando que os dados epidemiológicos disponíveis não revelaram indícios evidentes de efeitos nocivos sobre os parâmetros da saúde humana, enquanto usado como aditivo alimentar [5].

1.2 Métodos de análise usados na detecção de adoçantes

Uma grande variedade de métodos, baseados em diferentes princípios, tem sido aplicada na determinação de compostos presentes em alimentos, bebidas e produtos dietéticos. A maioria dos métodos descritos no contexto deste trabalho é aplicada à

análise de adoçantes na forma individual. Como é cada vez mais usual fazerem-se combinações, torna-se cada vez mais premente desenvolver métodos analíticos capazes de determinar vários edulcorantes em simultâneo.

Da grande variedade de métodos utilizados para a determinação de edulcorantes em diferentes matrizes alimentares, os métodos cromatográficos têm recebido um amplo reconhecimento. Actualmente, a técnica mais popular nesta área é a cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*). Uma ampla gama de colunas de separação juntamente com uma grande variedade de detectores faz da HPLC uma técnica “universal” para espécies moleculares e iónicas. A análise destas últimas é baseada em cromatografia iónica (do inglês IC, *Ion Chromatography*), uma ferramenta útil na análise de múltiplos adoçantes em produtos alimentares. Ela utiliza na separação de componentes de uma amostra, soluções salinas, inócuas e baratas em vez de solventes orgânicos.

A electroforese capilar (do inglês CE, *Capillary Electrophoresis*) é outra técnica de separação atraente, útil para a determinação simultânea de edulcorantes. Em algumas situações a CE parece mais vantajosa que a cromatografia, quer em termos de poder de separação, quer em tempo de análise, quer no baixo consumo de solventes.

Quando há a necessidade de determinar apenas um ou dois adoçantes numa dada amostra, é muitas vezes mais razoável aplicar métodos simples, rápidos, reprodutíveis, especialmente desenvolvidos para o produto específico. Os métodos electroquímicos e espectroscópicos, proporcionam resultados analíticos num curto espaço de tempo, sobretudo quando associados a sistemas de análise por injeção em fluxo (do inglês, FIA *Flow Injection Analysis*).

Todos os métodos referidos têm sido amplamente utilizados na determinação do acessulfame de potássio, sacarina, ciclamato e aspartame.

1.2.1 Cromatografia líquida

Este é método mais utilizado para a determinação de adoçantes artificiais [6]. A amostra a analisar é introduzida em pequenas quantidades numa coluna. Ao longo deste percurso os vários componentes atrasam-se diferencialmente. O tempo que demora cada componente a sair da coluna denomina-se tempo de retenção e depende das interações químicas ou físicas do analito com a fase móvel e a fase estacionária. No caso particular da cromatografia líquida (do inglês, LC *Liquid Chromatography*) a retenção é originada pela atracção ou repulsão electrostática entre os iões de cada uma das fases; a retenção ou repulsão dos componentes da amostra depende se as cargas são idênticas ou opostas relativamente à fase estacionária. A utilização de

pressão aquando da introdução da amostra na coluna cromatográfica incrementa a velocidade linear dos compostos, melhorando a resolução do método. Os eluentes mais utilizados são a água, o metanol e o acetonitrilo.

Os sistemas de detecção presentes no fim da coluna são a espectrofotometria UV/VIS [7], amperometria [8], coulometria [9] e a espectrometria de massa [10].

A cromatografia em camada delgada (do inglês, TLC Thin-layer chromatography) é bastante utilizada para a identificação e determinação de edulcorantes artificiais [11]. devido à sua facilidade experimental e ao seu baixo custo. Nesta cromatografia a fase estacionária é suportada uma por uma placa plana micro porosa semelhante ao papel. A fase móvel desloca-se através da placa por capilaridade ou por gravidade.

1.2.2 Cromatografia gasosa

A cromatografia gasosa (do inglês GC, *Gas Chromatography*) é pouco utilizada como ferramenta analítica para a determinação de edulcorantes devido à baixa volatilidade destes compostos [12]. Antes da análise, os edulcorantes devem ser convertidos em compostos voláteis, o que é principal desvantagem do GC. Esta etapa não é apenas trabalhosa e demorada, mas também uma fonte erros.

1.2.3 Electroforese capilar

A eletroforese capilar CE é uma ferramenta poderosa na análise de alimentos. Devido ao seu elevado poder de resolução, baixo consumo de solventes e facilidade de automação, a CE é uma alternativa viável ao HPLC. Diferentes modos de CE são utilizados na análise de adoçantes individuais ou misturas de edulcorantes [13]. É um método de análise que se baseia na separação de moléculas carregadas sob a influência de um campo eléctrico.

1.2.4 Análise por injeção em fluxo

A análise por injeção em fluxo (FIA) é uma técnica para a determinação automatizada e em contínuo, processando um grande número de amostras. O inconveniente é poder determinar, apenas, um ou dois adoçantes em cada amostra. A utilização de metodologias FIA apresenta ainda vantagens como a utilização de pequenas quantidades de amostra e reagentes, alta reprodutibilidade, rapidez de análise, operação simples. Baseiam-se na injeção da amostra num fluxo transportador impulsionado por uma bomba, originando uma dispersão contínua durante o percurso

em direcção a um detector, onde são realizadas as leituras.

1.2.5 Técnicas electroquímicas

Relativamente à determinação de edulcorantes, foi possível encontrar alguns trabalhos baseados em técnicas electroquímicas [14]. Estas técnicas baseiam-se nas propriedades eléctricas das substâncias a analisar em solução, sendo as mais comuns a potenciometria, a conductimetria, a voltametria, a electrogravimetria e a coulometria. Elas são versáteis para a determinação de adoçantes artificiais, porque são simples, rápidas e de baixo custo. Além disso, permitem a análise directa das amostras, mesmo quando as soluções envolvidas são turvas e/ou coloridas. Podem ser usadas na análise de um ou mais adoçantes, separados ou em misturas com produtos alimentares.

1.2.6 Técnicas espectroscópicas

As técnicas espectroscópicas são, genericamente, muito utilizadas na determinação de edulcorantes em alimentos. Baseiam-se na resposta que a grande maioria das moléculas fornece quando se faz incidir um feixe de radiações electromagnéticas. As gamas do espectro electromagnético mais utilizadas neste tipo de análise correspondem ao ultravioleta (UV), ao visível (Vis) e ao infravermelho.

As radiações electromagnéticas interagem, essencialmente, com os electrões de valência. As moléculas, principalmente as orgânicas, possuem ligações covalentes do tipo π cujos electrões que são facilmente excitáveis. Absorvem radiações a determinados comprimentos de onda e passam para orbitais energeticamente superiores. Depois, ao voltarem ao estado de relaxação, devolvem a energia absorvida através de radiações com comprimentos de onda energeticamente inferiores e (ou) através de deformações elásticas das moléculas.

Mesmo quando a substância a analisar não apresenta características que permitam a sua análise directa, é possível transformá-la numa espécie absorvente. Um exemplo desta situação é a formação de um complexo com o analito que apresente características de absorção numa dada região espectral, pressupondo coloração sempre que se trate de radiação visível.

Quando este princípio é acoplado a uma superfície de reconhecimento/aquisição de sinal, toma a designação de sensor óptico. Um sensor desta natureza apresenta diversas vantagens do ponto de vista analítico. É uma unidade de baixo custo, resposta rápida e portátil, permitindo a realização de análises *in situ* e fornecendo

resultados em tempo real. Neste sentido, uma metodologia baseada em sensores ópticos para a despistagem de adoçantes em alimentos/bebidas poderia constituir uma alternativa vantajosa aos demais métodos publicados na literatura.

1.3 Sensores ópticos

Um sensor mede o valor absoluto ou a variação de uma propriedade física, convertendo-a num sinal que pode ser medido por um observador ou um instrumento. No caso particular de um sensor óptico, ou optosensor, a propriedade física envolvida é a luz. De um modo geral, o sensor óptico é constituído por um elemento emissor de luz, que transforma um sinal eléctrico num sinal óptico, e um elemento de recepção de luz, que transforma o sinal óptico em um sinal eléctrico (Hulanicki *et al.*, 1991).

Em termos práticos, a luz e o objecto são os componentes principais neste processo de monitorização da cor. O observador ou um equipamento de medida assumem também um papel primordial neste contexto, em virtude da sua intervenção directa no resultado final.

1.3.1 Luz

Sob o ponto de vista do observador, a luz é aquilo que os nossos olhos conseguem detectar. Sob o ponto de vista físico a luz é constituída por "partículas" ínfimas, chamadas fótons, que se deslocam à velocidade da luz. Essas "partículas" geram, no seu deslocamento, um campo electromagnético oscilante que interage com a matéria por onde se difunde, por isso, também se chamam radiações electromagnéticas.

As radiações electromagnéticas não se cingem aquilo que os nossos órgãos visuais conseguem ver. Existem um vasto espectro de radiações electromagnéticas que vão desde raios cósmicos até às ondas rádio. A figura seguinte é elucidativa e representa o vasto espectro electromagnético.

As radiações electromagnéticas transportam energia (E). Essa energia depende da sua frequência (ν) e é proporcional à constante de Plank (h '), segundo a equação 1.1. Por outro lado, a frequência das radiações electromagnéticas é inversamente proporcional ao comprimento de onda (λ), sendo que o produto da frequência e do comprimento de onda de uma radiação iguala a velocidade da luz (equação 1.2).

Introdução

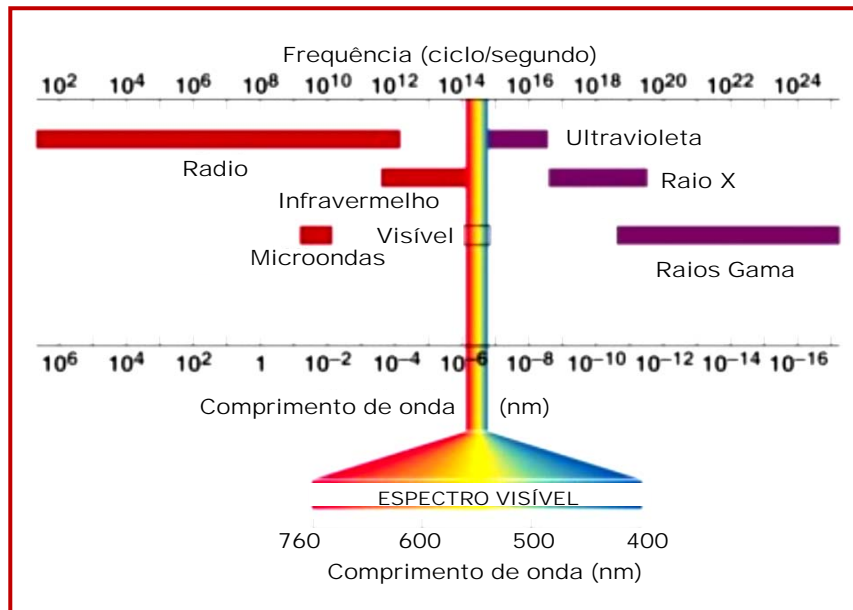


Figura 1.2 - Espectro eletromagnético.

$$E = h' \times \nu \quad (\text{eq. 1.1})$$

$$\lambda = c / \nu \quad (\text{eq. 1.2})$$

O espectro da luz visível abrange radiações com um comprimento de onda (λ) entre, aproximadamente, 400 e 700 nm. A luz é caracterizada pela sua distribuição espectral e, na perspectiva do observador, os comprimentos de onda das radiações relacionam-se com as cores do arco-íris segundo a Figura 1.3. O arco-íris não é mais do que a luz branca sujeita ao processo de refração, apresentando as radiações eletromagnéticas ordenadas segundo o comprimento de onda. Aos nossos olhos, a luz com emissão semelhante ao longo de todo o espectro parecerá branca, enquanto a predominância de emissão num intervalo restrito do espectro relativamente à restante corresponderá à cor que se relaciona com essa gama.

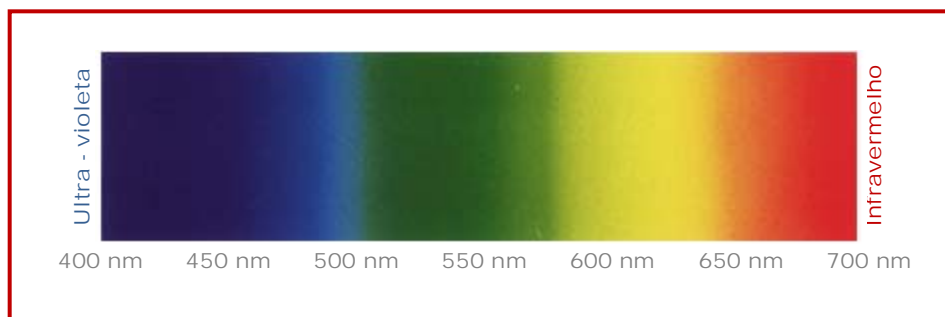


Figura 1.3 – Cores do espectro eletromagnético na região visível.

Tendo em conta as inúmeras e variadas fontes de luz existentes a CIE (*Commission Internationale de L'Eclairage*), organismo que estabelece as normas na área da luz/cor definiu vários padrões iluminantes, devidamente tabelados [15]. Os que mais se destacam são os correspondentes às luzes mais comuns do quotidiano, representados na Figura 1.4.

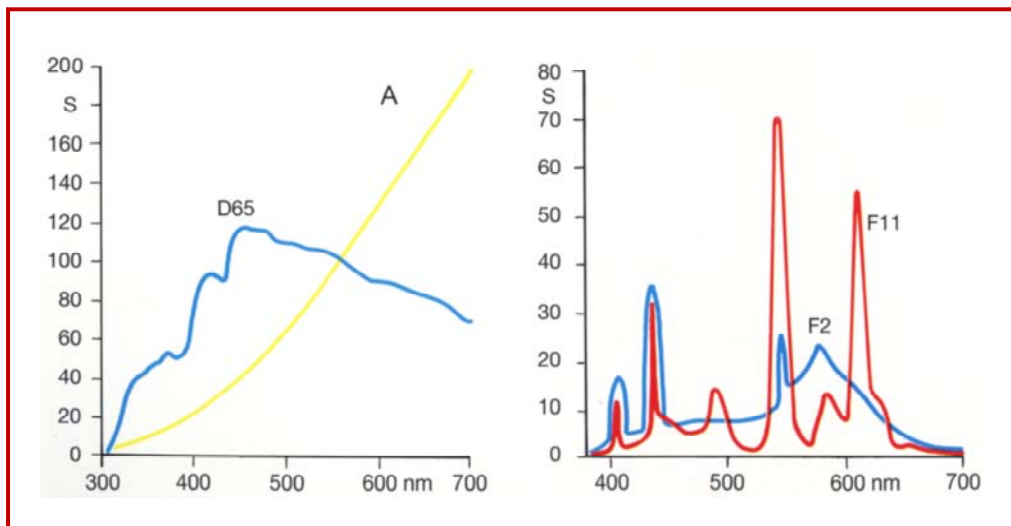


Figura 1.4 – Distribuição da energia espectral relativa de diversos padrões iluminante: luz do dia (D65), lâmpada incandescente (A), lâmpada fluorescente TL84 da Philips (F11) e lâmpada fluorescente “fria” (F2).

1.3.2 Objecto

Quando um feixe de luz incide num objecto podem ocorrer diversos fenómenos, em simultâneo ou de forma isolada. São eles a reflexão especular, reflexão difusa, transmissão especular, transmissão difusa e finalmente a absorção da luz.

Quando a luz é reflectida no ângulo oposto ao da incidência acontece a reflexão especular (Figura 1.5). A reflexão da luz acontece porque ela é devolvida e designa-se por especular devido à simetria angular com que este fenómeno se processa. Este fenómeno associa-se a objectos cuja superfície apresenta uma elevada regularidade. Um exemplo típico desta situação é a de um espelho.

Mas se o feixe de luz atravessa um objecto homogéneo e, apesar de sofrer um desvio devido à refacção da luz, a direcção permanece inalterada, isto é, o ângulo de transmissão é idêntico ao de ângulo de incidência, o fenómeno observado é a transmissão especular (Figura 1.6). Designa-se transmissão porque atravessa o objecto e especular porque não há variação do ângulo inicial. Um caso típico é um vidro transparente.

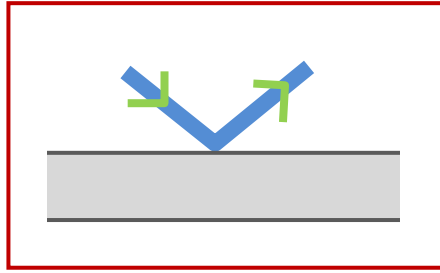


Figura 1.5 – Reflexão especular

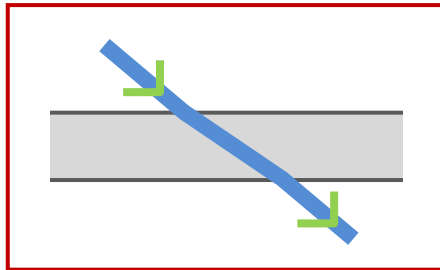


Figura 1.6 – Transmissão especular.

Quando a superfície do objecto é irregular, a luz incidente sobre ele será reflectida em diversos ângulos. O número de ângulos será tanto maior quanto mais irregular for a superfície. Chama-se a este fenómeno reflexão difusa (Figura 1.7). A reflexão resulta da devolução da luz, sendo difusa devido à forma como é difundida em todas as direcções. O caso típico é uma folha de papel branca.

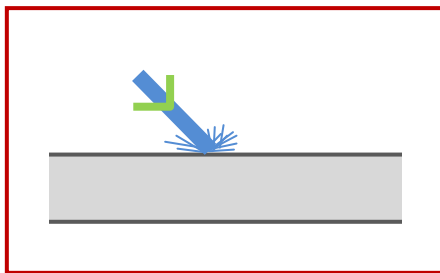


Figura 1.7 – Reflexão difusa

Quando um objecto resulta de uma subdivisão ínfima de um dado material ou de redes de fibras microscópicas originará uma infinidade de efeitos de refacção. Neste caso, a luz incidente será sucessivamente sujeita a desvios relativamente ao seu percurso original (Figura 1.8). Como resultado da dispersão no interior do objecto, parte da luz será devolvida de forma dispersa (reflexão difusa) e outra parte atravessará o objecto também em várias direcções (transmissão difusa).

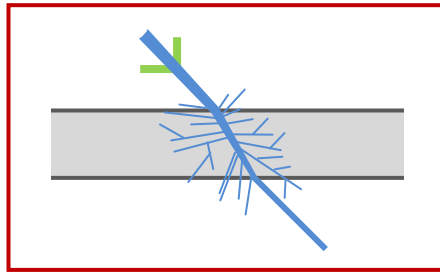


Figura 1.8 – Objecto com reflexão especular, transmissão especular, reflexão difusa e transmissão difusa.

Se a luz que se difunde no objecto encontrar, ao longo do seu percurso, substâncias que absorvam preferencialmente radiações electromagnéticas pertencentes a determinadas gamas do espectro, o objecto será colorido de acordo com os intervalos de comprimento de onda absorvidos/reflectidos. Por exemplo, um objecto será vermelho quando a luz que nele incidiu foi selectivamente absorvida na gama compreendida entre 400 e 650 nm e só as radiações correspondentes ao vermelho, entre 650 e 700 nm, se mantiveram intactas.

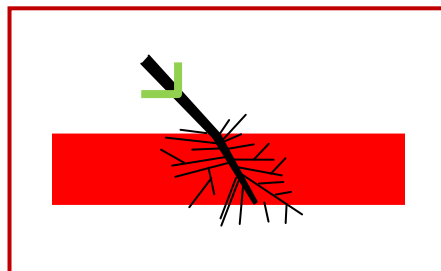


Figura 1.9 – Objecto com corante vermelho

A forma mais usual de quantificar a cor de um objecto é medir a percentagem espectral de radiação reflectida, $\%R(\lambda)$, ou transmitida, $\%T(\lambda)$, ao longo de todo o espectro visível. Para este efeito, torna-se necessário medir a intensidade de luz espectral transmitida, $I_t(\lambda)$, ou reflectida, $I_r(\lambda)$, proveniente do objecto, e a intensidade de luz espectral que incide sobre o objecto, $I_i(\lambda)$. A relação entre estas unidades encontra-se expressa nas equações 1.3 e 1.4.

$$I_r(\lambda) / I_i(\lambda) \times 100 = \%R(\lambda) \quad (\text{eq. 1.3})$$

$$I_t(\lambda) / I_i(\lambda) \times 100 = \%T(\lambda) \quad (\text{eq. 1.4})$$

A relação entre a radiação reflectida e a transmitida é responsável pela coloração dos objectos. Em termos gerais, um objecto negro não reflecte nenhuma (ou absorve toda) luz ao longo do espectro e um objecto branco reflecte toda (ou não absorve nenhuma) luz (Figura 1.10). Um objecto colorido reflecte a faixa de radiações correspondente à sua cor e absorve a faixa complementar.

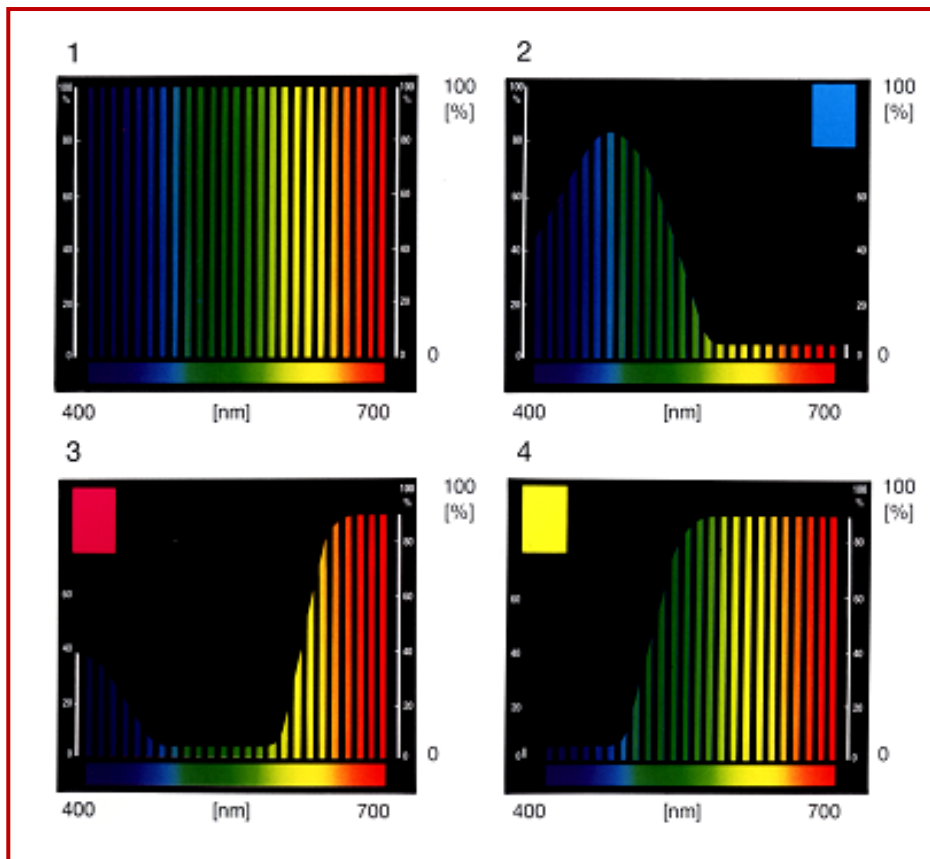


Figura 1.10 - Espectros de reflectância para objectos de cores diferentes.

1.3.3 Observador

Em termos gerais a imagem que cada indivíduo observa resulta da incidência de luz numa zona no interior do globo ocular chamada retina, constituída por células sensíveis à luz. Estas células subdividem-se em bastonetes, que nos conferem a visão

acromática em ambientes nocturnos ou de baixa luminosidade e cones, que nos conferem a sensação da cor em ambientes diurno ou de alta luminosidade. Os cones são divididos em três categorias: os cones X sensíveis à zona vermelha do espectro, os cones Y sensíveis à zona verde do espectro e os cones Z sensíveis à zona azul do espectro. Quando a luz é predominantemente vermelha são os cones X os mais estimulados. Se a luz for verde estimulam-se preferencialmente os cones Y e quanto a luz é azul são os cones Z os mais estimulados. Esses estímulos são enviados para o sistema nervoso central na forma de impulsos eléctricos e originam a sensação, meramente emocional, da cor.

A CIE estabeleceu dois observadores padrão com o objectivo de padronizar esta medida. Os valores esperados estão devidamente tabelados [16], representando-se um destes observadores na Figura 1.11.

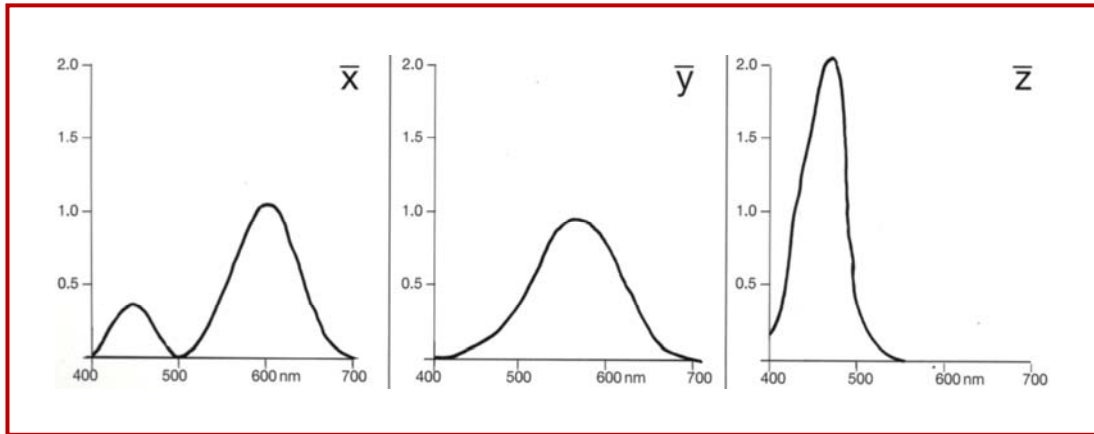


Figura 1.11 - Sensibilidade espectral relativa de um observador standard segundo a CIE

A determinação dos valores globais de estimulação é efectuada com base na distribuição espectral de energia de um iluminante $S(\lambda)$, espectro de reflectância da cor $\%R(\lambda)$ e as sensibilidades espectrais relativas, $\bar{x}(\lambda)$, $\bar{y}(\lambda)$ e $\bar{z}(\lambda)$ de acordo com as equações de 1.5 a 1.7.

$$X = \sum S(\lambda) \times \%R(\lambda) \times \bar{x}(\lambda) \quad (\text{eq. 1.5})$$

$$Y = \sum S(\lambda) \times \%R(\lambda) \times \bar{y}(\lambda) \quad (\text{eq. 1.6})$$

$$Z = \sum S(\lambda) \times \%R(\lambda) \times \bar{z}(\lambda) \quad (\text{eq. 1.7})$$

A determinação da fracção de estímulo de cada tipo de cone é calculada através das

equações 1.8 a 1.10. A Figura 1.12 representa o diagrama de cromaticidade da CIE e relaciona a cor visualizada por um observador padrão com a fração de estímulo de cada um dos três tipos de cone.

$$x = X / (X + Y + Z) \quad (\text{eq. 1.8})$$

$$y = Y / (X + Y + Z) \quad (\text{eq. 1.9})$$

$$z = Z / (X + Y + Z) \quad (\text{eq. 1.10})$$

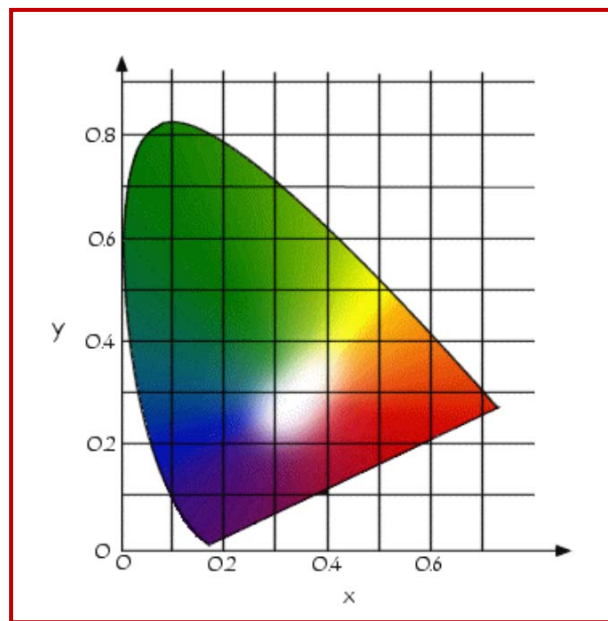


Figura 1.12 - Diagrama de cromaticidades de CIE

Para que uma cor seja caracterizada por uma linguagem comum e universal a CIE (Commission Internationale de L'Eclairage) criou um espaço de cor tridimensional que quantifica a cor segundo as coordenadas L^* (luminosidade de cor), a^* (componente vermelho/verde de cor) e b^* (componente amarelo/azul de cor). Estas coordenadas são calculadas com base nas equações 1.11, 1.12 e 1.13, uma vez conhecidos os valores tristímulos do iluminante (100% de reflectância), X_n , Y_n e Z_n . Os valores aqui obtidos são utilizados para calcular a cromaticidade ou saturação de cor (C^*) e a tonalidade de cor (h), de acordo com as equações 1.14 e 1.15.

$$L^* = 116 (Y / Y_n)^{1/3} - 16 \quad (\text{eq. 1.11})$$

$$a^* = 500 [(X / X_n)^{1/3} - (Y / Y_n)^{1/3}] \quad (\text{eq. 1.12})$$

$$b^* = 200 [(Y / Y_n)^{1/3} - (Z / Z_n)^{1/3}] \quad (\text{eq. 1.13})$$

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (\text{eq. 1.14})$$

$$h = \arctan (b^* / a^*) \quad (\text{eq. 1.15})$$

As entidades L^* , a^* , b^* , C^* e h são, na realidade, coordenadas de cor rectangulares e polares no espaço de cor da CIELab. O eixo L^* corresponde à luminosidade (claro/escuro) e é perpendicular ao plano formado pelos eixos a^* e b^* . O seu valor varia de 0 para o preto até 100 para o branco. Os eixos a^* e b^* são perpendiculares entre si e definem o plano de cromaticidade. Estes eixos interceptam-se no eixo L^* (eixo das acromaticidades referente ao preto, cinzentos e branco). Cores com a mesma tonalidade estão no plano a^* e b^* em linhas rectas com origem no eixo L^* . o comprimento dessa linha denomina-se cromaticidade ou saturação da cor e corresponde ao valor C^* . O ângulo de rotação h em graus é corresponde à tonalidade. Valores de h iguais a 0 ou 90 correspondem a uma cor predominantemente vermelha ou amarela e valores iguais a 180 ou 270 correspondem à cor verde ou azul.

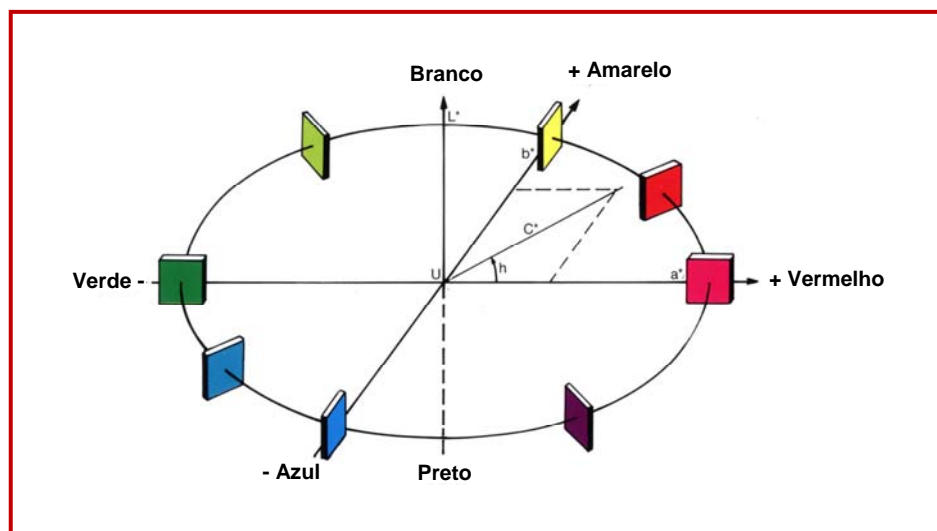


Figura 1.13 - Espaço de cor da CIELab, 1976

1.3.4 Equipamento de medida (transmitância/reflectância)

De uma forma geral, o espectrofotómetro é o equipamento de eleição para medir a cor como uma propriedade física da matéria. A cor não é mais do que a relação espectral entre intensidade de luz emitida pela amostra e a intensidade de luz emitida pela fonte de iluminação, transmitância (para amostras transparentes) a reflectância (para amostras translúcidas).

Em termos gerais, um espectrofotómetro é constituído por uma fonte de iluminação, constituída por uma lâmpada (flash de xénon, incandescente ou até leds) e uma fonte difusora de luz (uma esfera revestida a sulfato de bário), e um sistema óptico de lentes e fibras ópticas de duplo feixe, que transmite a luz proveniente, tanto da fonte de iluminação como da amostra até ao monocromador (Figura 1.14). O monocromador é constituído por redes de difracção de alta resolução que reflectem a luz já ordenada pelos seus comprimentos de onda. A luz reflectida incide num conjunto de micro-células fotoeléctricas devidamente posicionadas, convertendo-a em sinal eléctrico.

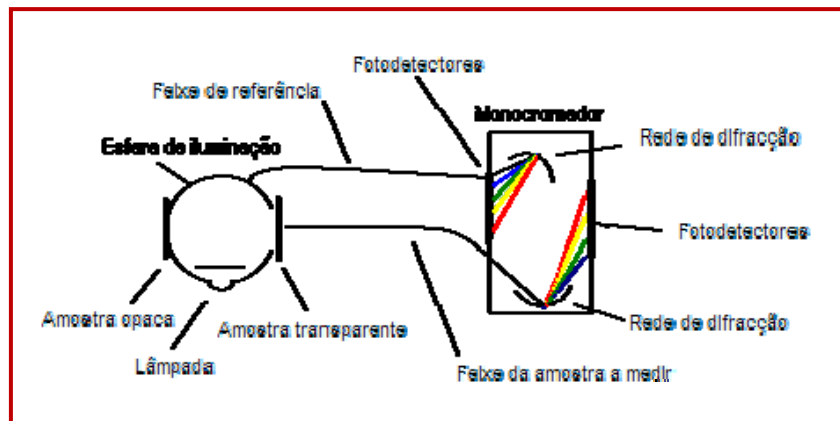


Figura 1.14 - Esquema de um espectrofotómetro de feixe duplo para medir amostras opacas ou transparentes

Existem vários modelos no mercado, mais vocacionados para amostras líquidas ou sólidas, ou para amostras transparentes ou opacas. No caso de medição em superfície sólida seria conveniente optar por uma sonda com fibra óptica associada a um sistema de aquisição de sinal apropriado. Para sistemas líquidos a solução mais conveniente passaria pela medida tradicional das soluções em cuvetes.

Independentemente do sistema utilizado, a monitorização da cor propriamente dita, a propriedade de interesse na avaliação de um sensor óptico capaz de ser interpretado por um observador, implica uma abordagem matemática sobre as coordenadas que a caracterizam.

1.4 Matemática da cor

A abordagem matemática sobre a cor depende do estado físico do sistema em estudo. Um sistema líquido (soluções ou meios transparentes) é suportado pela Lei de Lambert-Bourger-Beer [17], designada muitas vezes por Lei de Beer. Um sistema sólido (ou meios opacos ou translúcidos) recorre à Lei de Kubelka Munk [18].

1.4.1 Lei de Beer

Considere-se um meio transparente de espessura b atravessado por um feixe de luz monocromática (a um só comprimento de onda) com uma intensidade incidente, I_i , e uma intensidade transmitida, I_t . Ao longo da solução a intensidade de luz, I , vai sendo sucessivamente atenuada à medida que encontra centros absorventes de corante. A equação 1.16 caracteriza esta atenuação de acordo com coeficiente de absorção do corante em questão, K . Tendo em conta que a transmitância, T , é a razão entre as intensidades de radiação transmitida sobre a incidente, tomando sempre valores inferiores ou iguais a um (equação 1.17), a resolução do integral da equação 1.16 para a espessura b origina as equações 1.18 ou 1.19.

$$dI / db = -KI \quad (\text{eq. 1.16})$$

$$I_i / I_t = T \quad (\text{eq. 1.17})$$

$$I_i / I_t = T = e^{-Kb} \quad (\text{eq. 1.18})$$

$$-\log T = K.b \quad (\text{eq. 1.19})$$

Considerando que K depende das características específicas do meio corante e da sua concentração, o seu valor pode ser expresso de acordo com a equação 1.20, em que a representa a absortividade e c a concentração do corante. O valor de Absorvância, A , pode ser relacionado quer com a T quer com o valor de K (ver equação 1.21).

$$K = a \times c \quad (\text{eq. 1.20})$$

$$-\log T = a \times b \times c = A \quad (\text{eq.1.21})$$

Quanto num sistema líquido existem mais do que uma entidade absorvente (diferentes corantes), o valor total de A obtido (A_T) é o somatório da contribuição de cada componente (equação 1.22). Esta situação é aplicável desde que a Lei de Beer seja aditiva, estando garantida a não interacção entre os vários componentes presentes no sistema.

$$A_T = A_{\text{solvente}} + A_1 C_1 + \dots + A_n C_n \quad (\text{eq. 1.22})$$

1.4.2 Lei de Kubelka Munk

A abordagem para meios opacos ou translúcidos é semelhante à Lei de Beer, embora o modelo matemático seja substancialmente, diferente. Considere-se um meio com uma espessura x onde a luz seja absorvida e sucessivamente dispersada do seu trajecto original sobre um fundo com uma reflectância conhecida R_g . A intensidade de luz que atravessa o meio é designada por i e a intensidade de luz que retorna é designada por j . Enquanto i vai diminuindo com a espessura do meio devido a sucessivas absorções e dispersões, j vai aumentando em termos relativos devido a sucessivas dispersões. Os coeficientes de dispersão e de absorção foram representados por K e S . Então, convertendo as equações 1.23 e 1.24 numa só, resolvendo-a e integrando-a, surge a equação geral de Kubelka Munk (equação 1.25), onde R é a reflectância unitária para a espessura x e R_g a reflectância unitária para a espessura x igual a 0. Os valores de a e b podem ser obtidos através das equações 1.26 e 1.27.

$$di / (-dx) = -(K + S)i + Sj \quad (\text{eq. 1.23})$$

$$dj/dx = -(K+S)j + Si \quad (\text{eq. 1.24})$$

$$R = \frac{1-R_g (a - b \coth bSx)}{a - R_g + b \coth bSx} \quad (\text{eq. 1.25})$$

$$a = 1 + (K/S) \quad (\text{eq. 1.26})$$

$$b = (a^2 - 1)^{1/2} \quad (\text{eq. 1.27})$$

Como para uma espessura infinita obtemos uma dispersão infinita, a equação geral de Kubelka Munk simplifica-se na equação 1.28, em que R_{∞} é a reflectância unitária para uma espessura da amostra infinita (amostra opaca).

$$K/S = (1 - R_{\infty})^2 / 2R_{\infty} \quad (\text{eq. 1.28})$$

Analogamente à Lei de Beer, se meio opaco tiver diferentes entidades com características distintas em termos de absorção e de dispersão da luz, a relação K/S total será dada pelo somatório da contribuição individual de cada entidade (equação 1.29), à concentração em que cada um se encontra.

$$K_T/S_T = K_{\text{substrato}} + K_1c_1 + \dots + K_nc_n / S_{\text{substrato}} + S_1c_1 + \dots + S_nc_n \quad (\text{eq. 1.29})$$

2. Descrição Experimental

2.1 Considerações gerais

Houve uma avaliação prévia da prática laboratorial que envolvia cada uma das alternativas disponíveis para criar o sensor óptico. Tal avaliação permitiu adoptar uma prática laboratorial sistemática e abrangente, evitando tempo perdido na dispersão de utilização de material e equipamento, e também proporcionar condições idênticas às que iriam ser usadas no “terreno”.

O trabalho foi constituído por três etapas, estudo prévio do tipo de sensor mais adequado à situação em concreto, desenvolvimento e teste.

2.2 Material e equipamentos utilizados

Os ensaios foram todos efectuados em tubos de ensaio de 10 ml, as soluções foram preparadas em balões volumétricos de classe A, com capacidades de 50.00 a 500.00 ml. Para volumes inferiores recorreu-se a pipetas automáticas Gilson[®], modelos P20,

P100, P1000 e P5000 de volume regulável. As pesagens foram realizadas numa balança Mettler Toledo MS205DU, com precisão de 0,01g até 82g e 0.1mg até 220g. As leituras de absorvância foram efectuadas no espectrofotómetro Evolution 300 BB UV-Visible em cuvetes de quartzo. A medição do pH para a preparação das soluções tampão foi realizada no pH Meter GLP 22 da Crison.

2.3 Reagentes

A água utilizada na preparação das soluções proveio da rede geral tratada com resinas de permuta iónica, obtendo-se uma condutividade igual ou inferior a $0,054 \mu\text{S cm}^{-1}$, a 25°C . Todos os reagentes aqui mencionados são reagentes de análise com elevado índice de pureza, p.a. ou superior, provenientes de marcas comerciais bem conhecidas (Riedel-deHaen, Merck, Sigma ou Aldrich).

As soluções de sais de cálcio, prata, cobre (II), zinco, magnésio, mercúrio (II), estanho, chumbo, manganês, ferro (II), cádmio, níquel e bário, foram preparadas a partir dos respectivos sais de cloretos, nitratos e sulfatos.

As soluções aquosas mais concentradas foram preparadas por pesagem rigorosa dos sólidos e dissolução num volume rigoroso de em solvente apropriado. As menos concentradas foram obtidas por diluição rigorosa das anteriores.

Com excepção dos indicadores, todos os corantes mencionados foram identificados pelo seu nome comercial.

Os solventes testados na fase não aquosa foram o clorofórmio, o tetracloreto de carbono, o éter etílico, a acetona e os álcoois metílico e etílico.

Para ajuste de pH foi utilizada uma solução de fosfato de potássio 0,1 M, acidificada com ácido fosfórico e alcalinizada com uma solução concentrada de hidróxido de sódio.

2.4 Estudos preliminares

2.4.1 Obtenção de complexos corados

A possibilidade de formação de complexos corados foi testada para os 12 catiões seguintes: Ca^{2+} , Ag^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Hg^{2+} , Sn^{2+} , Pb^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} e Ba^{2+} . Para este efeito, transferiram-se 5,0 ml de solução de ciclamato de sódio, 0,1 M, para tubos de ensaio de 10 ml. A este volume adicionou-se a quantidade rigorosa de sal da espécie metálica de forma a obter uma concentração final em catião igual 0,1 M. Os

testes foram efectuados ao pH da água desionizada ($\approx 5,8$), a pH ácido (< 4) através da adição de duas gotas de ácido fosfórico concentrado e a pH alcalino (> 10) através da adição de duas gotas de hidróxido de sódio concentrado.

Os ensaios em branco deste estudo foram preparados substituindo a solução de ciclamato por água desionizada (pH $\approx 5,8$) e por água desionizada alterada para pH ácido (< 4) ou alcalino (> 10).

2.4.2 Transferência de cor entre fases imiscíveis através do ciclamato

Foram testados vários corantes de várias famílias para se seleccionar os três que garantiam uma transferência efectiva da fase aquosa para a fase de clorofórmio. Os ensaios foram realizados em tubos de ensaio de 10 ml contendo uma fase de 5 ml água desionizada ou solução de ciclamato de sódio 0,1 M, tendo sido acrescentado o peso de cada corante em pó de forma a obter a concentração de 100 g/l. A fase de clorofórmio foi de 2,5 ml.

2.5 Optimização e selecção do corante

Por motivos de natureza prática, estipulou-se que o volume total das duas fases não poderia ultrapassar 7,5 ml. Este volume permitia a homogeneização do tubo de 10 ml por agitação efectiva. A fase aquosa foi constituída por 1,0 ml de solução de corante mais 4,0 ml de solução a ser testada. O volume da fase clorofórmica foi igual a 2,5 ml. Estas condições mantiveram-se até ao fim do trabalho sem que houvesse necessidade de as alterar.

Cada corante foi testado de forma a obter na fase aquosa concentrações de corante iguais a 5, 10 e 20 g/l e concentrações de ciclamato de sódio iguais a 0, $1,0 \times 10^{-4}$, $5,0 \times 10^{-4}$, $1,0 \times 10^{-3}$, $5,0 \times 10^{-3}$, $1,0 \times 10^{-2}$ e $5,0 \times 10^{-2}$ M.

O corante seleccionado foi a Azul Astrazon BG e a sua concentração na fase aquosa foi igual a 5 g/l.

2.6 Efeito do pH

Este estudo foi realizado de modo semelhante ao indicado anteriormente, substituindo a água desionizada nas soluções base de corante e ciclamato de sódio por solução tampão. Neste sentido, a fase aquosa perfazia 5,0 ml, distribuídos entre 1,0 ml de solução de corante e 4,0 ml de solução a ser testada. A fase de clorofórmica

apresentava um volume igual a 2,5 ml. Foi preparada uma solução tampão de fosfato de potássio 0,1 M com ajuste do pH mediante a adição de solução de hidróxido de sódio concentrado ou de ácido fosfórico concentrado. Mais uma vez, o procedimento foi o equivalente ao adoptado no ponto anterior, fixando-se neste caso a concentração de corante em 5 g/l e variando as concentrações de ciclamato de sódio (0 , $1,0 \times 10^{-4}$, $5,0 \times 10^{-4}$, $1,0 \times 10^{-3}$, $5,0 \times 10^{-3}$, $1,0 \times 10^{-2}$ e $5,0 \times 10^{-2}$ M).

2.7 Interferentes

O efeito de espécies eventualmente interferentes foi avaliado de modo análogo ao efectuado para o estudo de pH. A fase aquosa compreendia 1,0 ml de solução de corante e 4,0 ml de solução a ser testada e a fase clorofórmica apresentava um volume total de 2,5 ml. Foram preparadas soluções de frutose e de sacarose com concentrações iguais a 5, 10 e 20 g/l. Posteriormente, prepararam-se soluções base de corante e ciclamato de sódio com cada uma das soluções de frutose e sacarose de forma a obter a concentração de corante de 5 g/l e concentrações de ciclamato de sódio de 0 , $1,0 \times 10^{-4}$, $5,0 \times 10^{-4}$, $1,0 \times 10^{-3}$, $5,0 \times 10^{-3}$, $1,0 \times 10^{-2}$ e $5,0 \times 10^{-2}$ M.

2.8 Aplicação do sistema sensor

O sensor foi aplicado na análise de vinho. Para este efeito, o volume de 4,0 ml de amostra a ser testada foi adicionado a um tubo de ensaio contendo 2,5 ml de clorofórmio e 1,0 ml de solução de corante foi adicionado. O método pode ser calibrado em função das intensidades de cor obtidas mediante a alteração de concentração do corante e a alteração do volume de cada uma das fases, mas tal não foi necessário.

3. Resultados e Discussão

3.1 Considerações gerais

Sendo este capítulo destinado a analisar resultados obtidos e, em função deles, discutir e decidir qual o passo seguinte a dar, tentou-se transcrever de uma forma mais fidedigna possível o raciocínio subjacente a cada decisão, deste a pesquisa até à obtenção do resultado final. Também houve o cuidado de, apesar do objectivo final ser um meio de apreciação visual por si subjectiva, tentar sempre justificar as opções tomadas com base em valores medidos.

Numa fase inicial optou-se por ensaiar a formação de complexos corados entre o ciclamato e diversas espécies metálicas. Posteriormente, optou-se por explorar a capacidade que o ciclamato apresenta em alterar o coeficiente de partilha de um corante entre duas fases imiscíveis.

3.2 Formação de complexos corados

A formação de complexos corados entre espécies inorgânicas e o ciclamato seria, à

partida, uma solução promissora, devido à facilidade com que as moléculas orgânicas formam complexos corados. Neste estudo ensaiaram-se os catiões Ca^{2+} , Ag^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Hg^{2+} , Sn^{2+} , Pb^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Ba^{2+} , Ba^{2+} em água desionizada ($\text{pH} \approx 5,8$), meio ácido ($\text{pH} < 4$) e meio alcalino ($\text{pH} > 8$). A utilização destas 3 regiões de pH claramente distintas prendeu-se com a interferência típica das espécies H^+ ou OH^- em reacções colorimétricas. Os efeitos mais esperados neste estudo seriam a solubilidade das espécies metálicas (tipicamente superior a pH ácido) e a alteração da cinética ou dos produtos da reacção em causa (originando perda ou alteração de cor). Os resultados obtidos neste estudo encontram-se representados nas fotografias seguintes (Figuras 3.1 a 3.3).

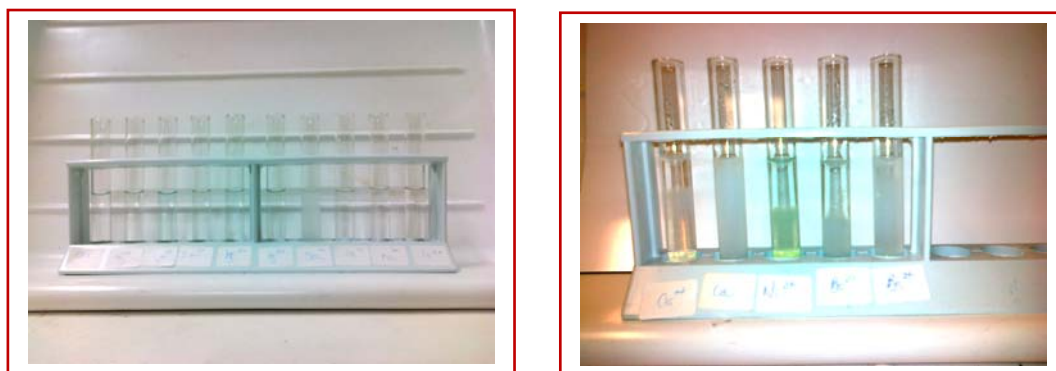


Figura 3.1 Obtenção de cor por complexação em $\text{pH} \approx 5,8$.

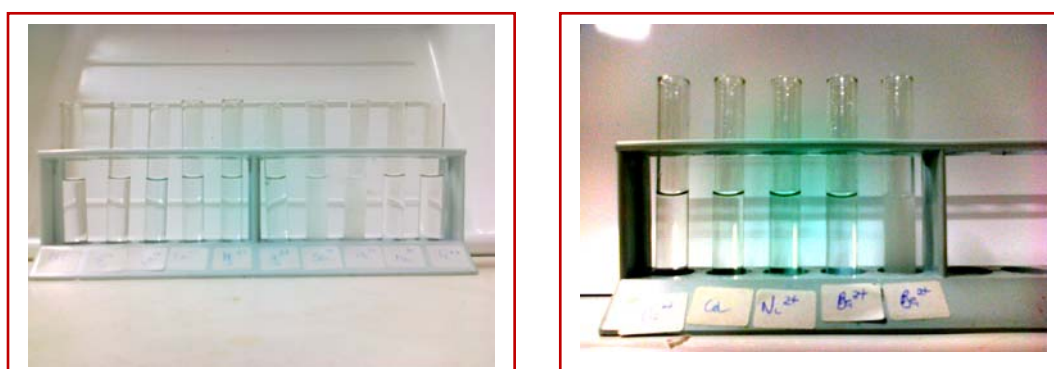


Figura 3.2 Obtenção de cor por complexação em $\text{pH} < 4$.

Apesar da qualidade das fotografias não ser a melhor, verifica-se, para alguns catiões, a existência de cor a um $\text{pH} \approx 5,8$ devido à cor conferida pelo respectivo sal. Verifica-se o desaparecimento de cor a um $\text{pH} < 4$ e à obtenção ou agravamento de cor a um $\text{pH} > 10$. No entanto, a realização de ensaios sem ciclamato de sódio conduziu exactamente às mesmas cores, nas mesmas condições. Neste sentido, as cores e

(ou) a translucidez que se vêem nas fotografias não foram obtidas devido à acção do ciclamato de sódio.

Nesta fase pensou-se que o aparecimento de um complexo corado com o ciclamato não seria simples. Poderia requerer, nomeadamente, uma terceira espécie ou condições de ensaio muito particulares.



Figura 3.3 Obtenção de cor por complexação em pH > 10.

Mantendo em vista o propósito de desenvolver uma metodologia simples, optou-se por abandonar esta ideia e testar a hipótese de interferência do ciclamato na partilha de corantes entre duas fases.

3.3. Transferência de corante entre duas fases imiscíveis

Este método baseia-se na transferência de uma corante da fase aquosa para a fase clorofórmica. O princípio subjacente é bastante simples. O ciclamato em fase aquosa liga-se ao corante, provavelmente por interacção electrostática, diminuindo a sua solubilidade em fase aquosa e contribuindo para a sua transferência para a fase orgânica. O corante, que é muito pouco solúvel em clorofórmio, só se transfere devido à sua ligação ao ciclamato. Assim, quanto maior for a concentração de ciclamato menos intensa é a cor na fase aquosa e mais intensa é a cor na fase de clorofórmio.

O corante ideal será aquele que só passará para a fase de clorofórmio em função do ciclamato que passar, por isso sem ciclamato não deverá existir (ou existir o menos possível) corante na fase de clorofórmio. Com excesso de ciclamato não deverá existir (ou existir o menos possível) corante na fase aquosa.

Testaram-se vários tipos de moléculas corantes para verificar a sua compatibilidade com este método. Os ensaios foram realizados em tubos de ensaio contendo uma

fase aquosa de 5 ml com as concentrações de 20 g/l de corante e 0,1 M de ciclamato e uma fase de clorofórmio de 2,5 ml. Nas figuras seguintes podem-se ver cada um dos corantes. O primeiro tubo de ensaio contém corante sem ciclamato, o segundo tubo de ensaio contém corante com ciclamato. A fase clorofórmica é a mais densa, encontrando-se, por isso, na parte inferior do tubo de ensaio.






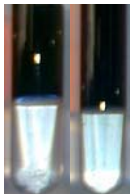
Corantes Reactivos	 <p>Vermelho Drimarene K8B</p>	 <p>Levafix Yellow CA</p>	 <p>Procion Flavin HEXL</p>
Corantes Dispersos	 <p>Azul Resolin KBBL</p>		
Corantes Directos	 <p>Solophenil Green BLE</p>		
Corantes Ácidos	 <p>Marinho Lanaset KWL</p>		

Figura 3.4 Ensaio com diversos corantes.

Os resultados não foram, nesta fase, medidos mas analisados por percepção visual. Além do método ter por objectivo uma comparação visual dos resultados obtidos, a

medição não acrescentava nada de significativo nesta fase de pré-selecção. Os resultados obtidos foram esclarecedores. Os corantes básicos mostraram ter melhores propriedades para o método pretendido (Figura 3.4).

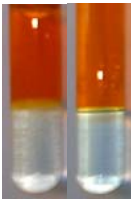







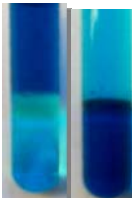
Corantes Indicadores	 <p>Laranja metileno</p>	 <p>Vermelho Metileno</p>	 <p>Azul metileno</p>
Corantes básicos ou catiónicos	 <p>Rosa Astrazon FG</p>	 <p>Flavin Astrazon 10 GGF</p>	 <p>Vermelho Astrazon FBL</p>
	 <p>Amarelo Astrazon GLE</p>	 <p>Verde Astrazon M</p>	 <p>Azul Astrazon BG</p>

Figura 3.4 Ensaio com diversos corantes (*continuação*)

Os pré-seleccionados para testes mais detalhados foram os corantes Azul Metileno, Verde Astrazon M, Amarelo Astrazon BGE e o Azul Astrazon BG. Este corantes originaram as diferenças mais significativas de intensidades de cor entre fases diferentes ou na mesma fase, com e sem ciclamato.

3.4 Efeito de tipo/concentração do corante

Testaram-se os corantes Azul Metileno, Verde Astrazon M, Amarelo Astrazon BGE e o Azul Astrazon BG, fazendo variar a concentração de ciclamato de sódio na fase aquosa, para diferentes concentrações de corante na fase aquosa. Posteriormente

mediram-se, no espectrofotômetro, os valores de absorvância de cada uma das fases, sempre obtidos ao comprimento de onda de absorvância máxima. Os resultados obtidos encontram-se representados nas figuras 3.5 a 3.8.

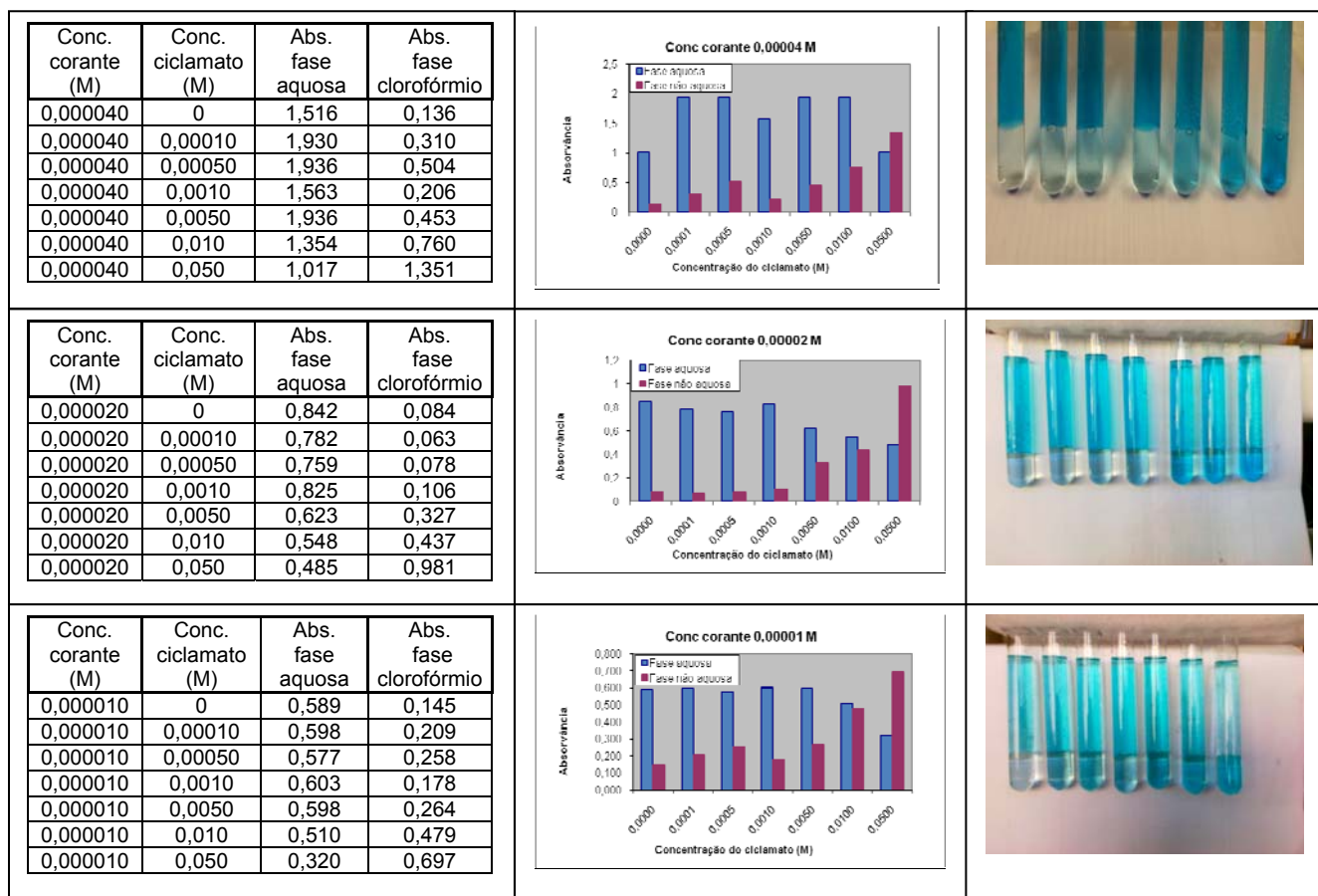


Figura 3.5 Absorvância versus concentração ciclamato relativamente ao corante Azul Metileno preparado com várias concentrações.

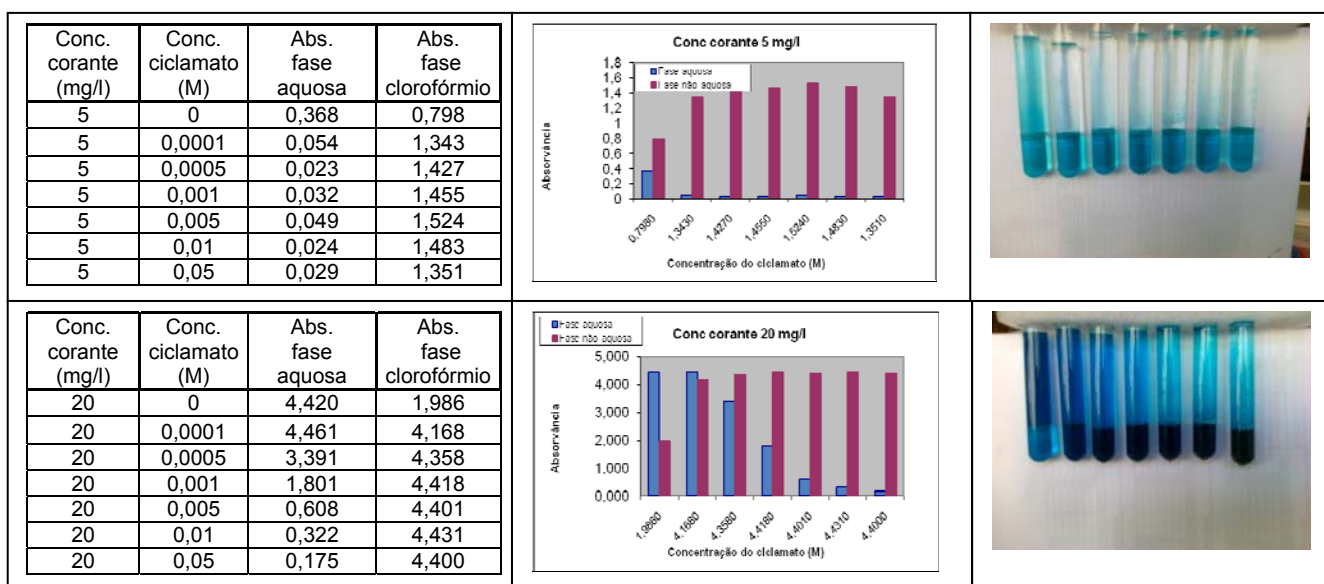


Figura 3.6 Absorvância versus concentração ciclamato relativamente ao corante Verde Astrazon M preparado com várias concentrações.

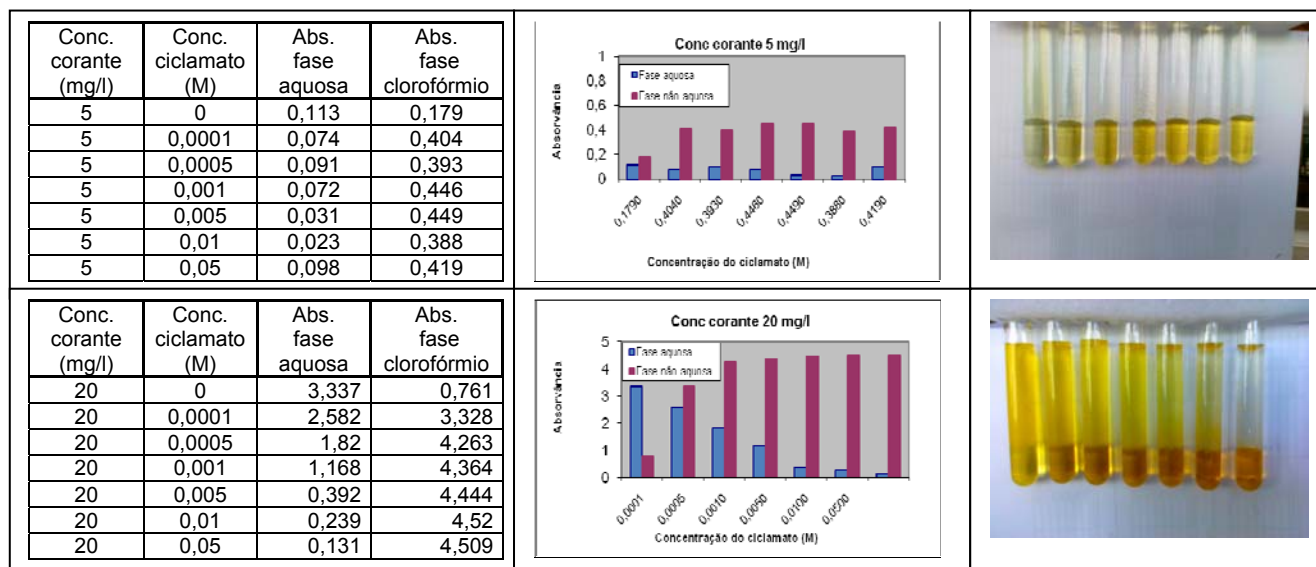


Figura 3.7 Absorvância versus concentração ciclamato versus concentração do corante Amarelo Astrazon BGE.

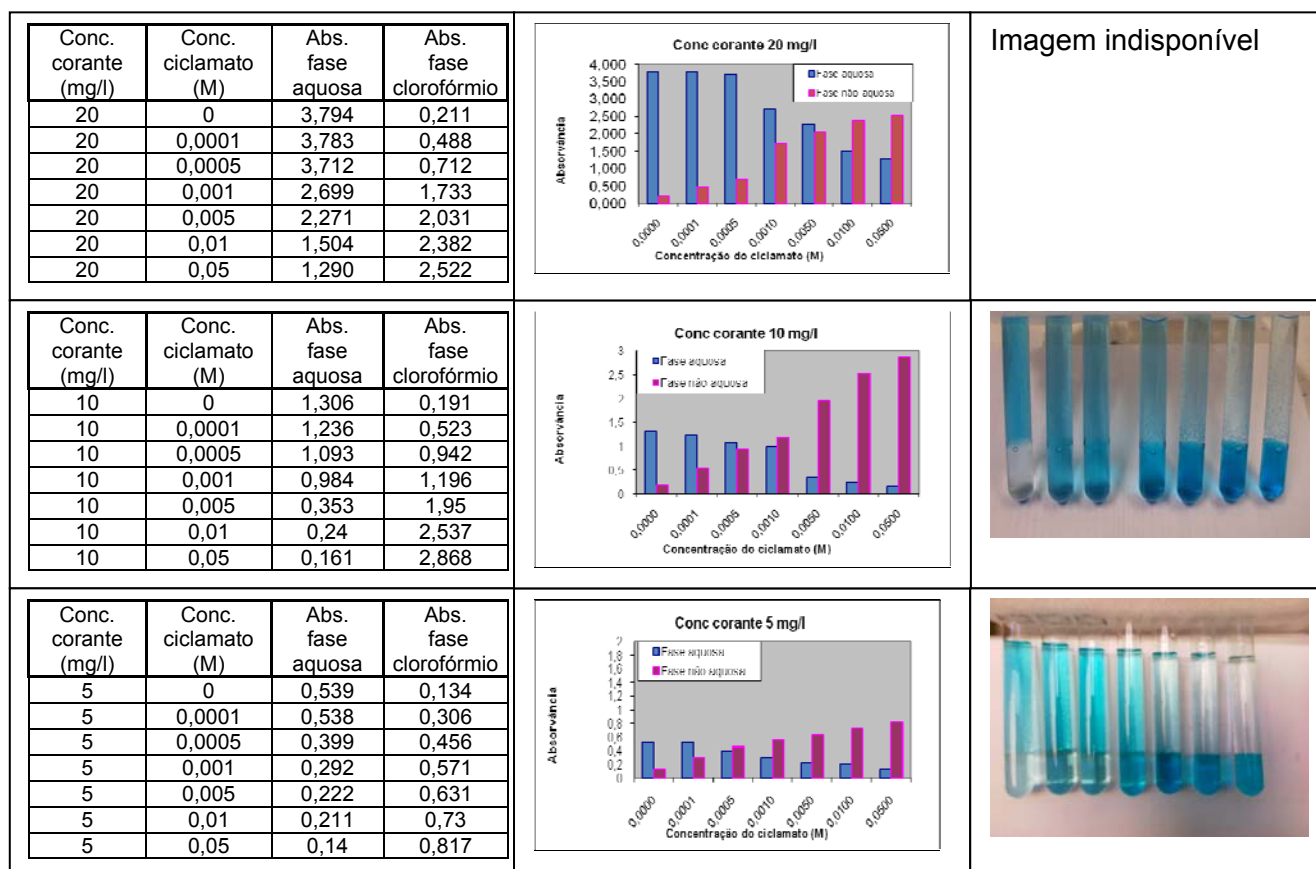


Figura 3.8 Absorvância versus concentração ciclamato versus concentração do corante Azul Astrazon BG.

Teoricamente, o melhor corante e a sua melhor concentração são escolhidos de acordo com os pressupostos seguintes:

- i. As colorações obtidas não devem ser muito intensas, de forma a não perder a percepção da variação de concentração. Em termos numéricos, isto significa que os valores de absorvância medidos não sejam superiores a 2, até onde geralmente se aplica a lei de Beer, quer na fase aquosa quer na fase de clorofórmica;
- ii. Deve ocorrer uma variação de intensidade de cor perceptível, em ambas as fases, desde a concentração zero até à concentração máxima de ciclamato. Em termos numéricos, isto significa que a diferença entre os valores de absorvância da concentração zero e máxima de ciclamato, em ambas as fases, seja a maior possível;
- iii. O ensaio em branco (concentração zero de ciclamato de sódio) deve ter a menor coloração possível na fase do clorofórmio. Em termos numéricos, isto significa que o valor mínimo de absorvância na fase do clorofórmio deva ser o mais baixo possível;
- iv. A coloração da fase aquosa deve ser a menor possível quando a concentração de ciclamato é máxima (neste caso foi considerado um limite máximo de 0,050 M). Em termos numéricos, isto significa que o valor mínimo de absorvância na fase aquosa seja o mais baixo possível.

Tendo em conta que a primeira condição exclui imediatamente muitos dos ensaios efectuados, pensou-se adequado estimar um factor de desempenho capaz de sugerir qual o melhor corante para o estudo em causa. Assumiu-se que um factor de desempenho plausível seria igual à diferença entre absorvâncias limite na fase aquosa, mais a diferença entre absorvâncias limite na fase de clorofórmio, menos absorvância da fase de clorofórmio à concentração de ciclamato igual a zero, menos a absorvância da fase aquosa à concentração máxima de ciclamato. Neste sentido, os factores de desempenho para corante e concentração ideal e não ideal são estimados segundo as equações 3.1 e 3.2.

$$\text{Factor de desempenho corante/concentração ideal: } (2-0)+(2-0)-0-0=4 \quad (\text{eq. 3.1})$$

$$\text{Factor de desempenho corante/concentração não ideal: } (2-0)+(0-2)-0-2=-2 \quad (\text{eq. 3.2})$$

Os valores obtidos de factor de desempenho para estes estudos foram indicados na tabela 3.1. Os resultados sugerem que a melhor relação corante/concentração é fornecida pelo Azul Astrazon BG a 5,0 mg/l.

Tabela 3.1 Factores de desempenho dos diversos corantes a diferentes concentrações.

Corante	Conc. corante	Factor de desempenho
Azul de Metileno	0,000040 M	0,561
Azul de Metileno	0,000020 M	0,685
Azul de Metileno	0,000010 M	0,356
Verde Astrazon M	5,0 mg/l	0,065
Amarelo Ouro Astrazon BGE	5,0 mg/l	-0,022
Azul Astrazon BG	5,0 mg/l	0,808

3.5 Efeito do pH

Usando o corante Azul Astrazon BG com uma concentração igual a 5,0 mg/l, fixou-se primeiro uma concentração intermédia de ciclamato (0,0050 M) fazendo-se variar o pH. Concluiu-se que existe uma influência do pH para valores extremos, principalmente para valores de pH elevados (Figura 3.9).

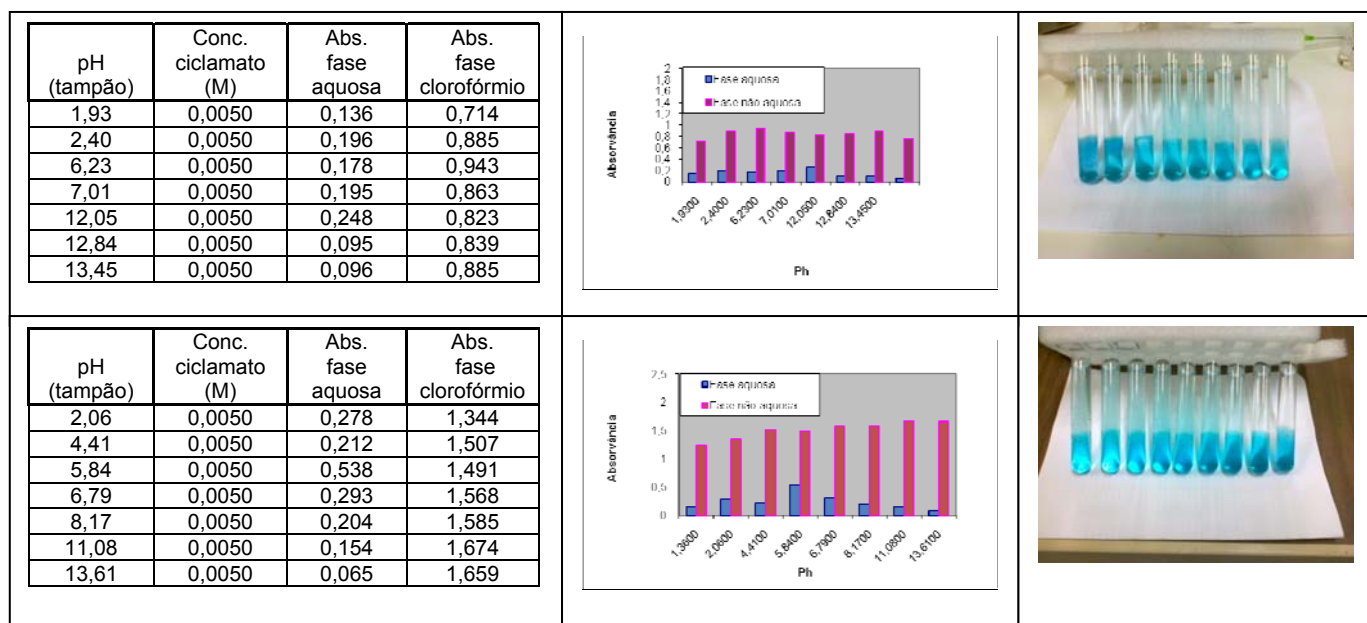


Figura 3.9 Absorvância versus pH à concentração de ciclamato de 0,0050 M.

De uma forma mais elaborada, mediram-se as absorvâncias, em ambas as fases, a diferentes valores de pH e diferentes concentrações de ciclamato de sódio tendo-se obtido os valores indicados na Figura 3.10.

Resultados e Discussão

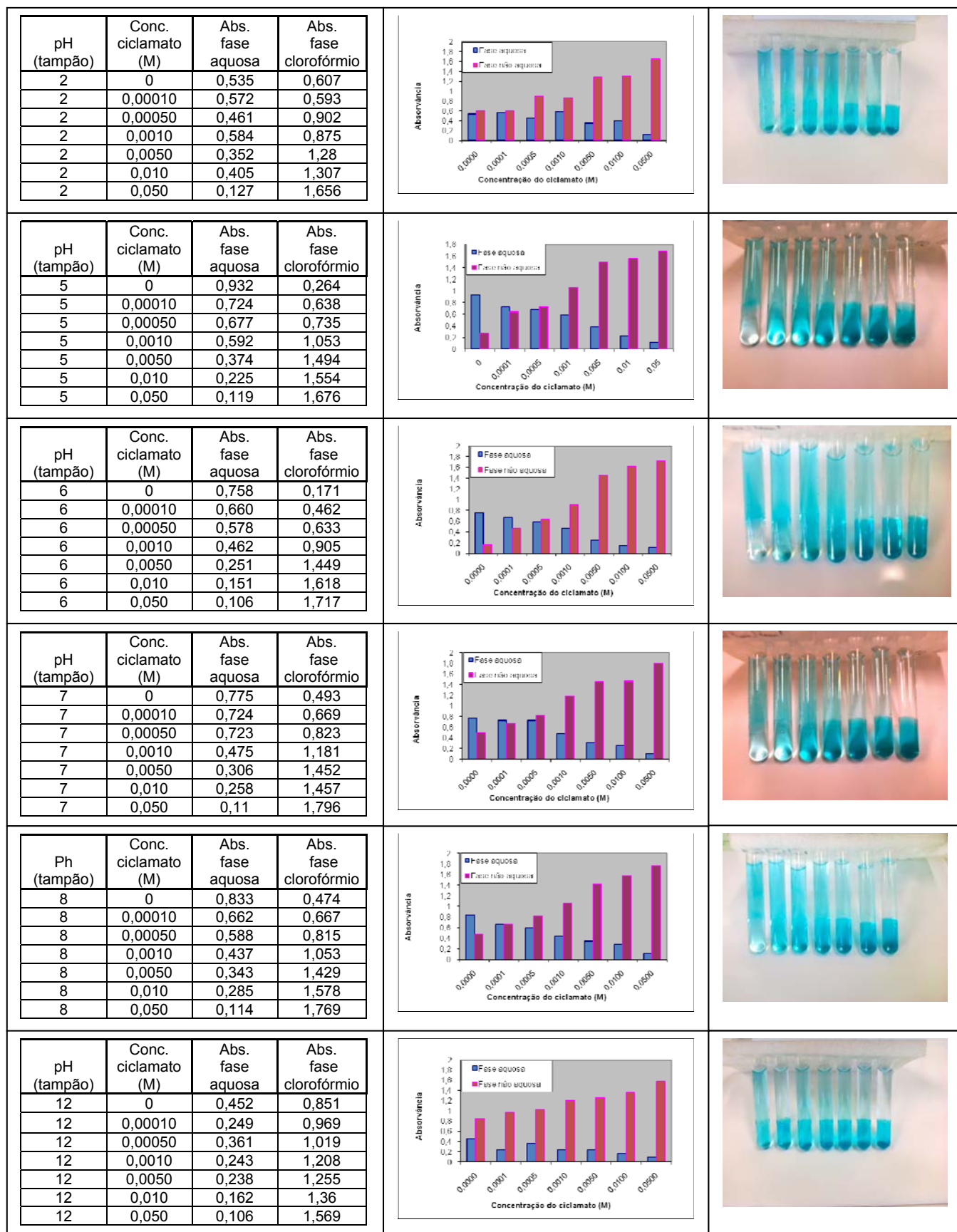


Figura 3.10 Absorvância versus concentração de ciclamato face a vários valores de pH.

O cálculo do factor de desempenho para o pH, baseado nos pressupostos indicados anteriormente, originou valores entre 0,11 e 1,91 (tabela 3.2). Perante os valores obtidos, concluiu-se que o melhor desempenho do corante ocorreu a pH 6.

Tabela 3.2 Factores de desempenho a diferentes valores de pH

pH tamponado	Factor de desempenho
2	0,723
5	1,842
6	1,921
7	1,365
8	1,426
12	0,107

3.6 Interferentes

Considerando que o método proposto tem por objectivo ser aplicado a amostras de vinho, optou-se pela medição da interferência da frutose e da sacarose. Estes dois açúcares são os mais representativos nos vinhos, estando presentes em grandes quantidades. A gama de concentração de açúcar testada variou entre 5 e 20 g/L. Os valores obtidos neste estudo encontram-se indicados na Figura 3.10.

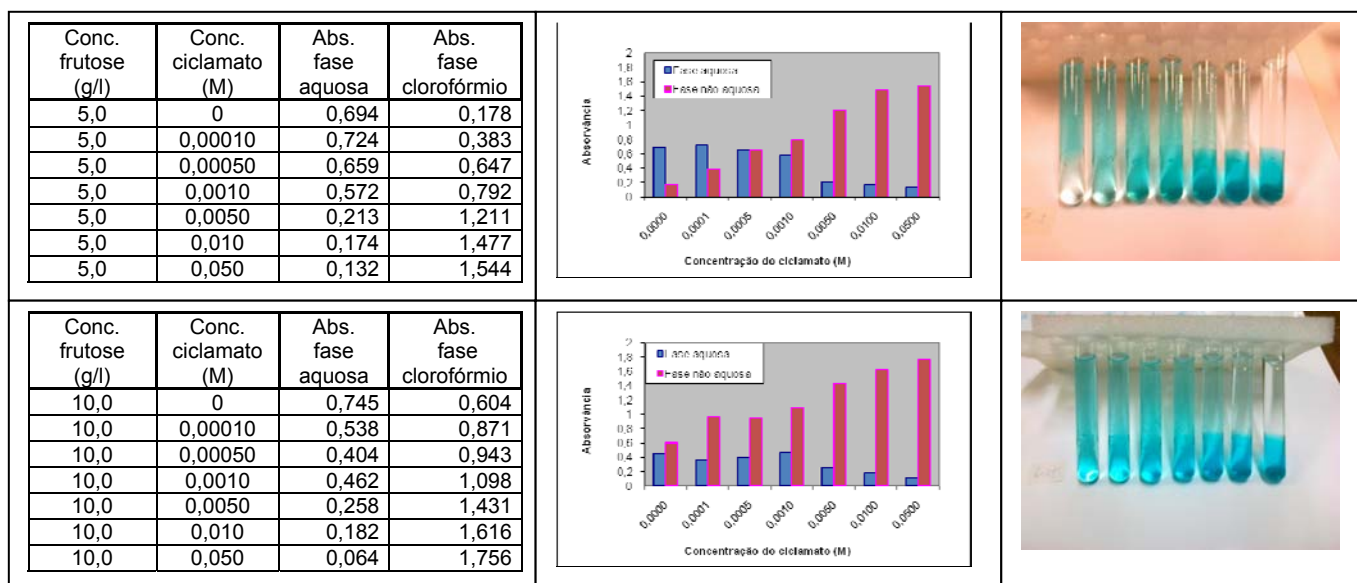


Figura 3.11 Absorvância versus concentração de ciclamato face a várias concentrações de frutose.

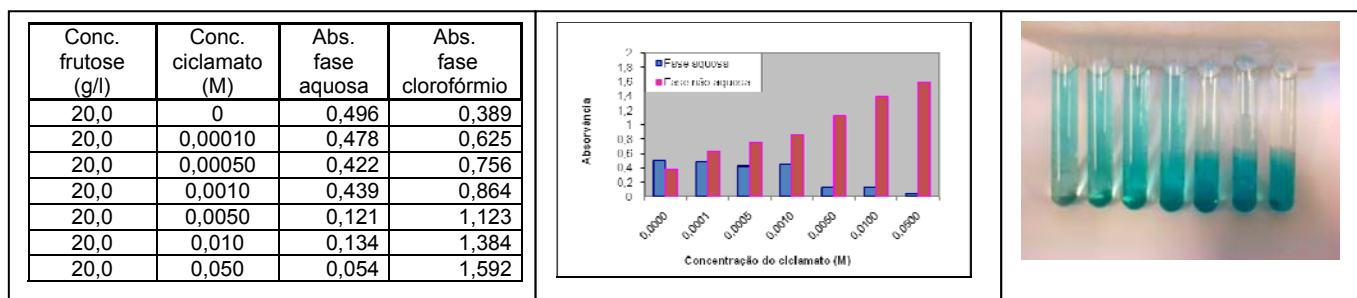


Figura 3.11 Absorvância versus concentração de ciclamato face a várias concentrações de frutose (*continuação*).

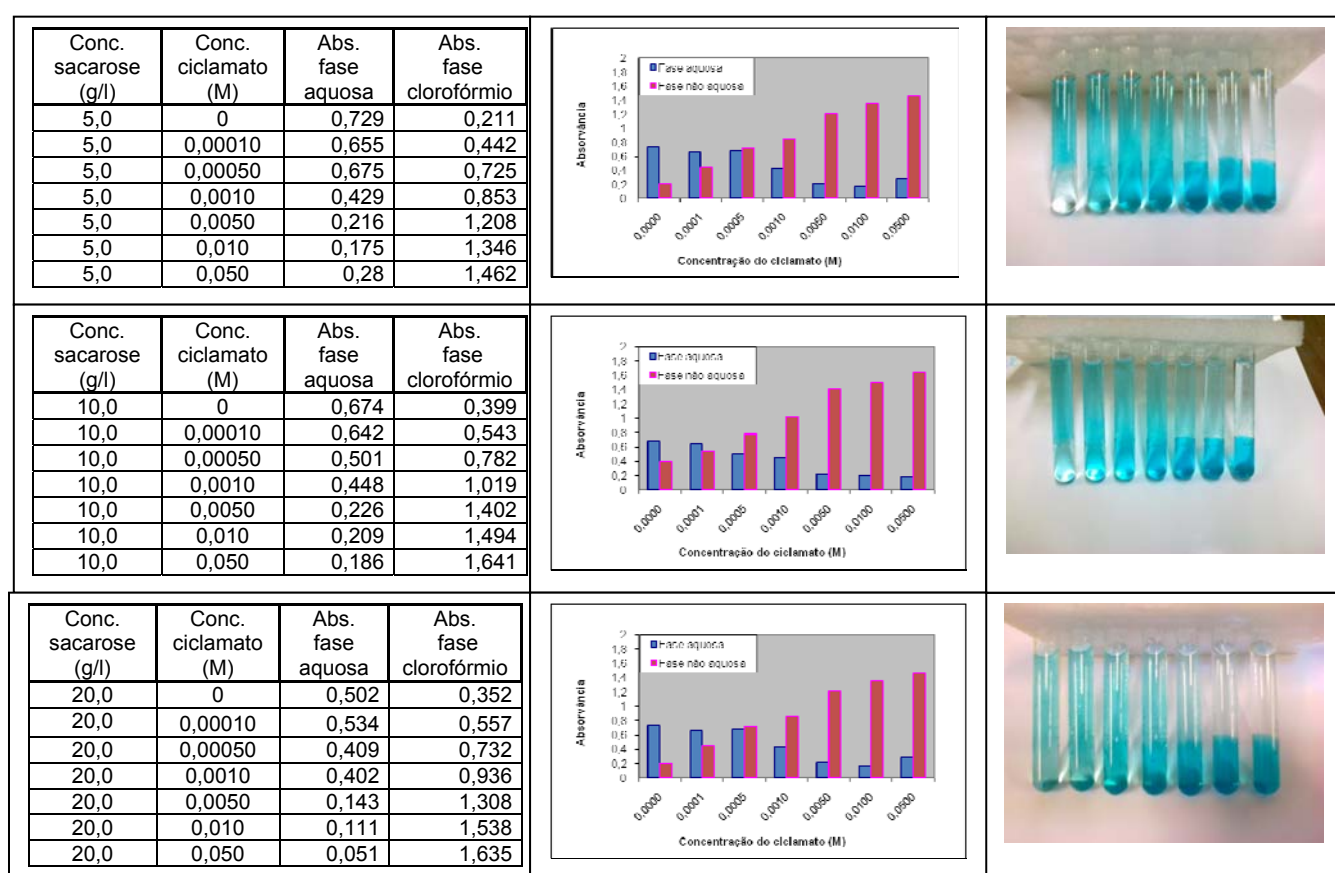


Figura 3.12 Absorvância versus concentração de ciclamato face a várias concentrações de sacarose.

Os resultados obtidos foram utilizados no cálculo dos factores de desempenho correspondentes a cada condição estudada (tabela 3.3). Os valores encontrados sugeriram que o contaminante que mais influenciou negativamente a leitura do ciclamato, ou conferiu menor desempenho ao corante, foi a sacarose.

Em termos gerais, a interferência causada pelos dois açúcares não foi significativa, já

que as alterações de coloração não foram grandemente perceptíveis. Os factores de desempenho obtidos foram também elevados e apresentavam uma gama de variação estreita.

Tabela 3.3 Factores de desempenho do corante na presença da frutose e sacarose a diferentes concentrações

Interferente / concentração	Factor de desempenho
frutose / 5 g/l	1,618
frutose / 10 g/l	1,165
frutose / 20 g/l	1,202
sacarose / 5 g/l	1,209
sacarose / 10 g/l	1,145
sacarose / 20 g/l	1,331

3.7 Teste com amostras de vinho

Finalmente testou-se o desempenho do corante em vinho com concentrações de açúcar total iguais 0,8 e 7,0 g/l. O vinho foi dopado com concentrações de ciclamato iguais às utilizadas nos procedimentos de calibração anteriores.

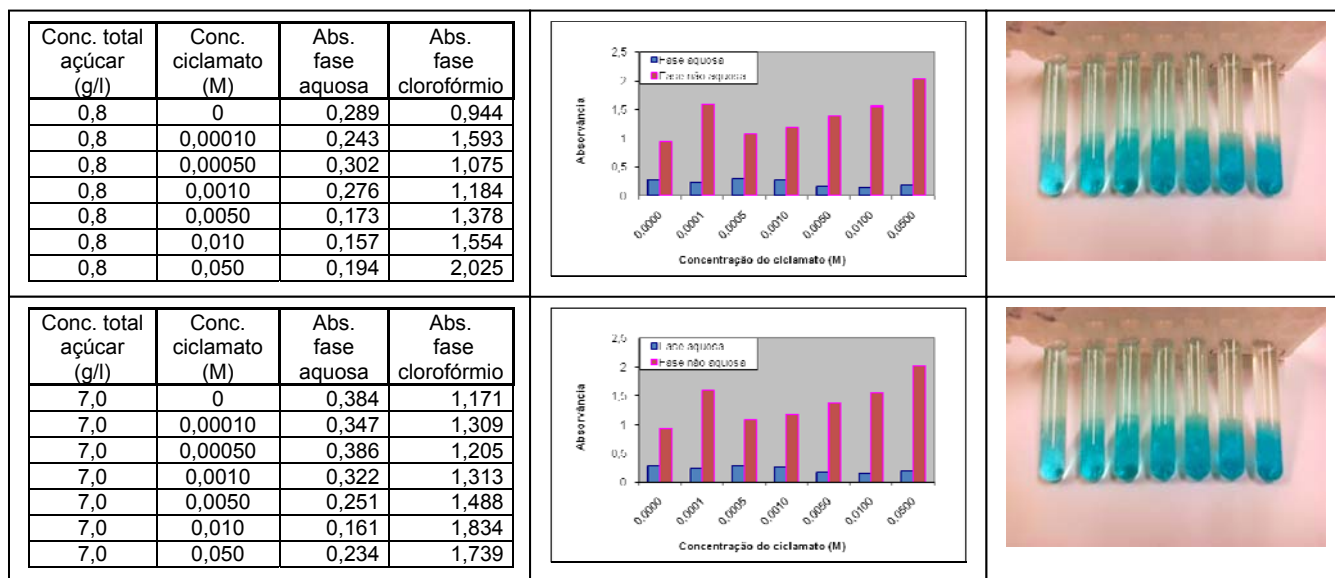


Figura 3.13 Absorvância versus concentração de ciclamato para duas concentrações diferentes de açúcar total.

Analisando os dados conclui-se que nem sequer foi necessário ciclamato de sódio para que o corante se transferisse para a fase de clorofórmio. Estes resultados indicaram que, para além da frutose e da sacarose, que já tinham sido testadas e não

representavam uma interferência desta dimensão, existe um outro composto que apresenta um comportamento semelhante ao do ciclamato. Ambas as amostras revelaram o mesmo carácter de interferência apesar de apresentarem concentrações de açúcar muito diferentes. Neste sentido, os resultados sugerem que os açúcares nada têm a ver com o comportamento observado.

Em suma, e como seria de esperar, o desempenho do corante em amostras de vinho foi muito baixo e até negativo.

Tabela 3.4 Factores de desempenho do corante em vinho com diferentes níveis de açúcar total

Vinho com açúcar total (g/l)	Factor de desempenho
0,8	0,038
7,0	-0,687

3.8 Alteração metodológica e sua aplicação

Considerando que existe um outro constituinte no vinho capaz de desempenhar um comportamento equivalente ao ciclamato, a associação de mais do que um solvente orgânico poderá conduzir a um método mais selectivo do que aquele estudado anteriormente. A presença de mais um solvente altera as características de partilha entre as duas fases do analito associado ao corante.

Por outro lado, a utilização de clorofórmio ao longo deste estudo não foi um acaso. Foram realizados testes preliminares com vários solventes orgânicos para além do deste, nomeadamente o tetracloreto de carbono, o éter etílico, a acetona e os álcoois metílico e etílico. A escolha do clorofórmio deveu-se ao facto de se querer diminuir, ao máximo possível, a passagem de corante que ocorria sem a presença de ciclamato. Nenhum dos outros solventes se constituiu como alternativa ao seleccionado

Nesta fase, optou-se pela adição de tetracloreto de carbono, em pequenas proporções, à fase orgânica de clorofórmio. Esta mistura permitiu inibir a transferência de corante, não só sem ciclamato mas como em todas as concentrações. A mistura seleccionada apresentava uma proporção de 4:1 (clorofórmio/tetracloreto de carbono). Os resultados de leitura de ciclamato em vinhos com teores muito diferentes de açúcar foram, desta vez, mais bem sucedidos (Figura 3.14).

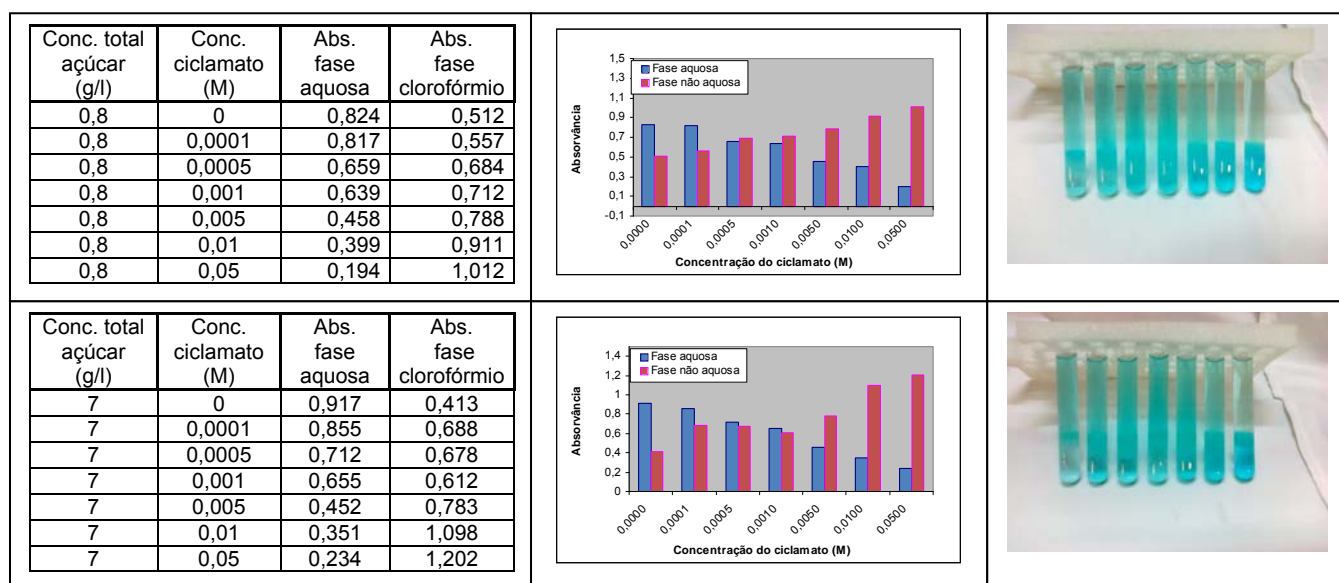


Figura 3.14 Absorvância versus concentração de açúcar total em vinho versus concentração de ciclamato

Os valores de desempenho do corante foram aceitáveis (tabela 3.5) para que o método fosse viável para despistar o ciclamato de sódio também em vinho. O inconveniente encontrado, mas não impeditivo, foi a formação de pequenas bolhas entre as duas fases, eliminando a linha nítida entre as intensidades de cor que era habitual.

Tabela 3.5 Factores de desempenho do corante em vinho com diferentes níveis de açúcar total utilizando uma mistura de clorofórmio/tetracloreto de carbono

Vinho com açúcar total (g/l)	Factor de desempenho
0,8	0,424
7,0	0,825

4. Conclusões

Analisando os resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que o método de transferência de corante entre fases imiscíveis é viável como sensor óptico de apreciação visual para despiste do ciclamato de sódio. Mas, não só é viável para despiste como será, muito provavelmente, viável como método de determinação exacta da concentração de ciclamato numa amostra. Seriam necessários ensaios mais completos e abrangentes para conferir um nível de precisão necessário num método de análise. Contudo, como o trabalho proposto foi a elaboração de um sensor óptico para despistar ciclamato de sódio em vinhos, considera-se que o objectivo foi plenamente atingido.

Como se requeria, o método é simples e fácil de usar. Basta ter um tubo de ensaio de 10 ml com 2,5 ml de clorofórmio/tetracloro de carbono (4:1) e 1,0 ml de solução de corante Azul Astrazon BG e perfazer com a amostra a analisar até os 7,5 ml. Para despistar o ciclamato pode-se comparar a coloração das duas fases: se a fase aquosa tiver uma coloração mais intensa do que a fase orgânica a concentração de ciclamato seria inferior a um valor previamente calibrado, caso contrário, seria superior. Na eventualidade de a amostra a analisar interferir na cor de uma das fases impedindo a

sua comparação, poder-se-ia utilizar um tubo padrão como comparação das colorações obtidas.

A simplicidade do método não se aplica só à sua utilização, mas também à forma como pode ser testado, encontram-se com mais facilidade formas de o tornar mais selectivo para uma substância específica a analisar e mais eficaz, fazendo variar o tipo de corante, natureza química das fases líquidas, etc. É de fácil calibração, podendo-se manobrar as colorações de cada fase, mediante a alteração de concentração do corante ou alterando o volume de cada uma das fases.

Finalmente não se pode deixar de realçar o potencial que este método apresenta para a análise múltipla e simultânea de adoçantes ou outras substâncias. À luz da matemática da combinação das cores (e foi por isso que foi abordado), se cada substância de uma mistura a analisar tiver um comportamento selectivo em termos de transferência de corante, com cor e natureza específica, entre duas fases, poder-se-ia prever a concentração de cada uma das substâncias mediante a decomposição da cor total nas cores individuais associadas a cada substância com as respectivas concentrações. Esta técnica de decomposição de cores é já bastante utilizada noutro tipo de aplicações.

Referências Bibliográficas

- [1] **Council directive 94/35/EC and European parliament, on sweeteners for use in foodstuffs**, Official Journal 237, 10 de Setembro de 1994, p. 3-24.
- [2] **Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs**, Agata Zygler, Andrzej Wasik, Jacek Namies´nik, Trends in Analytical Chemistry, Vol. 28, No. 9, 2009 (versão de PDF descarregada em 5 de Abril de 2010).
- [3] **Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs**, Agata Zygler, Andrzej Wasik, Jacek Namies´nik, Trends in Analytical Chemistry, Vol. 28, No. 9, 2009 (versão de PDF descarregada em 5 de Abril de 2010).
- [4] **Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs**, Agata Zygler, Andrzej Wasik, Jacek Namies´nik, Trends in Analytical Chemistry, Vol. 28, No. 9, 2009 (versão de PDF descarregada em 5 de Abril de 2010).
- [5] **Scientific committee on food, Revised opinion on cyclamic acid and its sodium and calcium salts**, 9 of march 2000, European commission health & consumer protection directorate-general, SCF/CS/EDUL/192 final, pp. 8.

- [6] **Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs**, Agata Zygler, Andrzej Wasik, Jacek Namies'nik, Trends in Analytical Chemistry, Vol. 28, No. 9, 2009 (versão de PDF descarregada em 5 de Abril de 2010).
- [7] **Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs**, Agata Zygler, Andrzej Wasik, Jacek Namies'nik, Trends in Analytical Chemistry, Vol. 28, No. 9, 2009 (versão de PDF descarregada em 5 de Abril de 2010).
- [8] **Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs**, Agata Zygler, Andrzej Wasik, Jacek Namies'nik, Trends in Analytical Chemistry, Vol. 28, No. 9, 2009 (versão de PDF descarregada em 5 de Abril de 2010).
- [9] **Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs**, Agata Zygler, Andrzej Wasik, Jacek Namies'nik, Trends in Analytical Chemistry, Vol. 28, No. 9, 2009 (versão de PDF descarregada em 5 de Abril de 2010).
- [10] **Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs**, Agata Zygler, Andrzej Wasik, Jacek Namies'nik, Trends in Analytical Chemistry, Vol. 28, No. 9, 2009 (versão de PDF descarregada em 5 de Abril de 2010).
- [11] **Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs**, Agata Zygler, Andrzej Wasik, Jacek Namies'nik, Trends in Analytical Chemistry, Vol. 28, No. 9, 2009 (versão de PDF descarregada em 5 de Abril de 2010).
- [12]. **Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs**, Agata Zygler, Andrzej Wasik, Jacek Namies'nik, Trends in Analytical Chemistry, Vol. 28, No. 9, 2009 (versão de PDF descarregada em 5 de Abril de 2010).
- [13] **Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs**, Agata Zygler, Andrzej Wasik, Jacek Namies'nik, Trends in Analytical Chemistry, Vol. 28, No. 9, 2009 (versão de PDF descarregada em 5 de Abril de 2010).
- [14] **Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs**, Agata Zygler, Andrzej Wasik, Jacek Namies'nik, Trends in Analytical Chemistry, Vol. 28, No. 9, 2009 (versão de PDF descarregada em 5 de Abril de 2010).

[15] **CIE Commission Internationale de L'Eclairage**

http://www.cie.co.at/index.php/LEFTMENUE/index.php?i_ca_id=298 (acedido em 23 de Setembro de 2010)

[16] **CIE Commission Internationale de L'Eclairage**

http://www.cie.co.at/index.php/LEFTMENUE/index.php?i_ca_id=298 (acedido em 23 de Setembro de 2010)

[17] Livro **Dyers' Company Publications Trust**, Society of Dyers and Colourists

[18] Livro **Dyers' Company Publications Trust**, Society of Dyers and Colourists.

Hulanicki, A, Geab, S, Ingman, F. Analytical chemistry division commission on general aspects of analytical chemistry, Chemical sensors: definitions and classification, Pure and applied Chemistry, 63, 1247-1250, 1991 (versão de PDF descarregada em 5 de Abril de 2010).

Flow-injection spectrophotometric determination of cyclamate in sweetener products with sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate, Carolina Cabero, Javier Saurina, Santiago Hernandez-Cassou (versão de PDF descarregada em 5 de Abril de 2010).

Rapid, Routine Method for the Analysis of the non-nutritive Sweeteners in Foodstuffs, C. S. P. Sastrya, K. Rama Srinivasa, K. M. M. Krishna Prasada and A. G. Krishnamacharyulub, *Analyst*, June 1995, Vol. 120 (versão de PDF descarregada em 5 de Abril de 2010).

A clean method for flow injection spectrophotometric determination of cyclamate in table sweeteners, Fabio R.P. Rocha, Eva Rodenas-Torralba, A'ngel Morales-Rubio, Miguel de la Guardiã, *Analytica Chimica Acta* 547 (2005) 204 – 208 (versão de PDF descarregada em 5 de Abril de 2010).

Spectrophotometric Determination of Sodium Cyclamate and Saccharin Sodium with Astrazone Pink FG, Kasim C. Guven and Tulin Ozol and Nurten Ekiz and Tamer Guneri, *ANALYST*. JULY 1984. VOL. 109, (versão de PDF descarregada em 5 de Abril de 2010).